

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Marburg

THERAPEUTISCHE UND CYTOPATHOLOGISCHE
EFFEKTE VON
N-METHYL-N- β -CHLORÄTHYLHYDRAZINDERIVATEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GERD WOLF

aus Lich

Marburg 1977

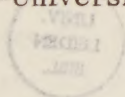
Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Marburg

THERAPEUTISCHE UND CYTOPATHOLOGISCHE
EFFEKTE VON
N-METHYL-N- β -CHLORÄTHYLHYDRAZINDERIVATEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn



von

GERD WOLF

aus Lich

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 26.9 1977
Dekan: Prof. Dr. med. Fr. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. K. J. Netter
Correferent: Dr. R. Braun

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
A. Material	4
1. Testsubstanzen	4
2. Chemikalien, Lösungen	5
3. Radioaktiv markierte Substanzen	9
4. Geräte, Hilfsmittel	10
5. Tumormaterial	10
6. Tiermaterial und Tierhaltung	10
B. Methoden	12
1-6 ad Ergebnisse III A	12,13
7 ad Ergebnisse III B	14
8,9 ad Ergebnisse III C	16,18
10 ad Ergebnisse III D	19
11-21 ad Ergebnisse III E	20-25
22 ad Ergebnisse III F	26
III. Ergebnisse	28
A. Therapieversuche	28
1. Bestimmung der akuten Toxizität von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin (A_1), seinem Benzaldehydhydrazon (B_1), N'-Methyl-N'- β -chloräthyl (3,4-dimethylbenzaldehyd)-hydrazon (B_3), N'- β -chloräthyl-benzaldehyd-hydrazon (Nor- B_1 , B_5) und N'Methyl-N'- β -	29

chloräthyl-(4-pyridylaldehyd)-hydrazon (B_6) sowie der kumulativen Toxizität von A_1 und B_1 und der subakuten und chronischen Toxizität von A_1 und B_1 bei der Maus

2. Beeinflussung der Vitalität von EATZ in vitro durch A_1 , B_1 und C	36
3. Therapie des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus und des Yoshida-Sarkoms der Ratte	38
B. Mitoseverhalten von EATZ in vivo unter A_1 , B_1 und C	53
1. Prämissen	53
2. Mitoseindex und Verschiebung der Mitosephasen	61
C. Das weiße Blutbild der Maus unter Behandlung mit B_1 und C	68
1. Prämissen	68
2. Leukocytenzahl und Differentialblutbild der NMRI-Maus bei hoher und niedriger Dosierung	69
3. Verhalten von Knochenmarksstammzellen der Maus (C57, black) in vitro und in vivo nach Stimulation mit CSF unter dem Einfluß von B_1	75
D. Immunologisches Verhalten der Maus nach Vorbehandlung mit B_1 -inkubierten und durch Schockgefrierung abgetöteten EATZ	79
1. Prämissen	79
2. Bestimmung der Angangsraten von EATZ bei der Maus in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit B_1	88
3. Immunologisches Verhalten der Tiere	92

E. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zum Nukleotidstoffwechsel von EATZ unter A ₁ und B ₁	98
1. Prämisse	98
2. Ausarbeitung eines geeigneten Trennverfahrens	102
a. Trennung mit verschiedenen Fließmitteln	103
b. Löslichkeit der Vergleichssubstanzen	104
c. Demonstration des Trennverhaltens	105
d. Methoden zur Isolierung markierter Substanzen von der DC-Platte	106
3. Markierung mit ³ H-Uridin	112
a. Optimierung der Aktivitätsausbeute	112
b. Beeinflussung der Aufnahme von ³ H-Uridin in EATZ und des Einbaus in die RNS durch B ₁	114
4. Beeinflussung der Aufnahme von ³ H-Thymin durch B ₁ in EATZ und des Einbaus in die DNS durch B ₁	120
5. Aufhebung der Einbauhemmung von ³ H-Thymin in die DNS von EATZ durch A ₁ und B ₁ bei Gegenwart von Purinnukleosiden	126
6a. Differenzierung zwischen Aufnahme- und Einbauhemmung von ³ H-Thymin und ³ H-Uridin durch Kältevorinkubation	131
6b. Bestimmung der RNS-Polymeraseaktivitäten von Rattenleber-Zellkernen unter A ₁ und B ₁	141
7. Untersuchungen zum Alkylierungsvermögen von A ₁ und B ₁	143

	Seite
F. Untersuchungen zur Cancerogenität von B ₁ , B ₂ und C	146
1. Prämissen	146
2. Kontrolle des weißen Blutbilds	150
3. Cancerogenität in Zeitabhängigkeit	153
IV Diskussion	158
V Zusammenfassung	167
VI Literaturverzeichnis	170

I. EINLEITUNG

Lange Zeit besaßen Hydrazin und seine Derivate neben technischem nur toxikologisches Interesse. Seit 1950 etwa fanden jedoch einige Hydrazinabkömmlinge Eingang in die medizinische Therapie. So werden als Tuberkulostatika Isonikotinsäurehydrazid (INH), (Domagk et al., 1952) und seine Hydrazone (Fox u. Gibas, 1953) sowie Thiosemicarbazone (Domagk et al., 1946) und Cyanessigsäurehydrazid (Valdecasas, 1952) eingesetzt. Das INH-Derivat Iproniazid (Isler et al., 1955) besitzt eine hemmende Wirkung auf die Monoaminoxidase, die daraus abgeleiteten MAO-Hemmer (Pletscher u. Zeller, 1960) haben heute keine größere klinische Bedeutung mehr als Antidepressiva. Als Antihypertonika finden Hydrazine (Drucy u. Ringer, 1951) wegen ihrer starken Wirkung auf die Gefäßmuskulatur Verwendung, sie werden aber auf Grund ihrer hohen Toxizität nur noch in Mischpräparaten eingesetzt. Die Hydrazone und Semicarbazide des 5-Nitrofurals (Chiura u. Reckendorf) besitzen gute chemotherapeutische Eigenschaften.

1958 beschreiben Preussman et al. die cancerotoxische Wirksamkeit von N,N-Bis-(β -choräthyl)-hydrazin, einer Substanz mit geringer therapeutischer Breite. Weitere Untersuchungen zur Cytotoxizität von Hydrazin und seiner Alkylderivate ergeben eine Beeinflussung der Glykolyse und des Zellwachstums von Bäckerhefe und Ehrlich Ascites Tumorzellen in vitro (Müller, 1960). Die cytostatisch wirksame Struktur wird von Zeller et al.

1963 und Bollag u. Grunberg, 1963 mit $\text{CH}_3\text{-NH-NH-R}$ angegeben. Auch in vivo kann (Weitzel et al., 1967) eine wachstumshemmende Wirkung von Hydrazin und Methylhydrazin auf das Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus nachgewiesen werden. Hemmend auf verschiedene experimentelle Tiertumoren wirken aber auch höhere Hydrazinderivate wie Dithiocarbamoylhydrazine (Shay et al., 1964), INH (Toth et al., 1967), 2-Hydrazino-5-nitropyridin (Prescott u. Caldes, 1970) und 1-Acetyl-2-Picolinoylhydrazin (Wilson et al., 1970).

Eine breite klinische Anwendung hat jedoch nur das Procarbazin (4-(2-Methylhydrazinomethyl)-N-isopropyl benzamid, Natulan^R) erfahren, das vorwiegend zur Therapie der Lymphogranulomatose eingesetzt wird.

Der cytostatische Wirkungsmechanismus soll auf der Bildung von H_2O_2 beruhen, das zur Fragmentierung von DNS führt (Bereneis et al., 1962 und Weitzel et al., 1963) und Methylierungsreaktionen am genetischen Material, wobei die N-Methyl Gruppe essentiell ist. Weiterhin reduziert Procarbazin den Mitoseindex und bewirkt Chromatidbrüche (Huang et al., 1968).

Untersucht werden daher in der vorliegenden Arbeit das von Böhme und Martin, 1974 synthetisierte N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin, eine Verbindung, die als chemisches Bindeglied zwischen den Methylhydrazinen und den cytostatisch wirksamen N-Lost-Verbindungen behandelt werden kann, sowie einige seiner Hydrazone. Bekannt sind über diese Substanzen bereits die

hemmende Wirkung auf Wachstum und Vermehrung von Hefezellen (*Sacch. cerevisiae*) (Braun et al., 1976 u. Braun u. Lange, 1976), starke cytostatische Aktivitäten in vitro (Braun et al., 1976) und eine Steigerung der aeroben Glykolyse bei Ehrlich-Ascites-Zellen (Braun et al., 1976), die im Gegensatz zur Glykolyse-depression unter Procarbazin und Löstderivaten steht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die therapeutischen Eigenschaften bei Transplantationstumoren der Maus (Ehrlich-Ascites-carcinom) und der Ratte (Yoshida-Sarkom) zu überprüfen. Durch Untersuchungen zum Mitoseverhalten von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (EATZ) in vivo sowie von Veränderungen ihres Nukleosidstoffwechsels in vitro sollten Einblicke in den Wirkungsmechanismus der N-Methyl-N- β -chloräthyl-hydrazinderivate erzielt werden.

Weiterhin sollte die Reaktion des weißen Blutbilds der Maus nach Applikation der Testsubstanzen in verschiedenen Dosierungsschemata Aufschluß über die allgemeine Zelltoxizität ermöglichen. Dazu dienten auch Versuche zur Erfassung einer cancerogenen Eigenwirkung.

Schließlich wurde untersucht, inwieweit mit N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon in vitro vorinkubierte, aber nicht abgetötete Tumorzellen noch in der Lage waren, nach Reimplantation bei der Maus einen immunologischen Schutz gegenüber einer erneuten Infektion mit unbehandelten Tumorzellen zu erzeugen.

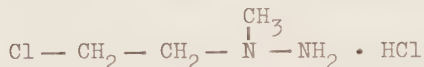
Zur besseren Beurteilung der erzielten Ergebnisse wurde bei einem Teil der Versuche Procarbazin als Bezugssubstanz herangezogen.

II. MATERIAL UND METHODEN

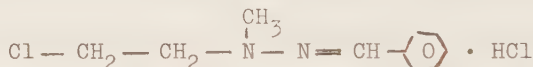
A. Material

1. Testsubstanzen

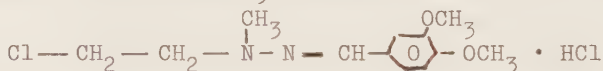
N-Methyl-N-β-chloräthylhydrazin · HCl (Substanz.A₁, MG=145



N'-Methyl-N'-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon · HCl
(Subst.B₁), MG=233



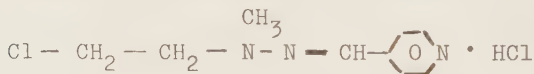
N'-Methyl-N'-β-chloräthyl-(3,4-dimethoxy-benzaldehyd)-hydrazon · HCl (Subst.B₃), MG=293



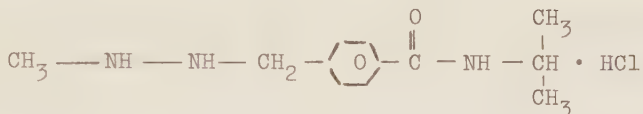
N'-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon · HCl (Subst.B₅),
MG=219



N'-Methyl-N'-β-chloräthyl-(4-pyridylaldehyd)-hydrazon
· HCl (Subst. B₆), MG=234



4-(2-Methyl-hydrazinomethyl)-N-isopropyl-benzamid • HCl
(Procarbazin, Natulan^R, Subst.C) MG = 258



2. Chemikalien, Lösungen

Aqua bidest wurde für alle wässrigen Lösungen verwendet

Auffangmedium

Modifiziertes Eagle's Medium nach Metcalf u. Moore (1971)	2.0 ml
3% Trypticase	0.5 ml
Aq. dest.	2.5 ml

Diäthyläther, wasserfrei durch CaCl₂-Zusatz

Endotoxin (Lipopolysaccharid W/S. abortus equi, Difco
Laboratories, Detroit)

Ergänzungsmedium

Modifiziertes Eagle's Medium nach Metcalf u. Moore	40 ml
3% Trypticase	10 ml
(50 mg/ml) DEAE Dextr.	0.15 ml (Endkonz. 75 µg/ml)
(6.6 mg/ml) 1-Asparagin	0.30 ml (Endkonz. 20 µg/ml)

Formalin Lösung 4%ig

Hämatoxylien Eosin Färbung

- Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie, Merck
- Eosin bläulich, Merck, in 1%iger wässriger Lösung

Heparin, Liquemin 5000^R, 1 ml enthält 25000 USP-E. Natrium-heparinat

Lysis Puffer:

1.5 mM HgII Cl_2	3.75 ml
5.0 mM 2-Mercapto EtOH	0.875 ml
10.0 mM Tris-Cl pH 7.5	25.0 ml

Modifiziertes Eagle's Medium nach Metcalf u. Moore (1971)

MEM Eagle's x 10	100 ml
NaHCO ₃	80 ml
MEM vitamins x 100	10 ml
MEM amino acids x 50	20 ml
MEM non essential amino acids x 100	10 ml
200 mM Glutamin Lösung	20 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Foetales Kälberserum	200 ml
l-Serin (21 mg/ml)	1 ml
Penicillin (2000000 i.E./ml)	0.85 ml
Streptomycin (200 mg/ml)	0.38 ml
Pferdeserum	50 ml
Aqua dest.	85 ml

Nährmedium zur Zellinkubation

- a) BME mit Earle's BSS mit Glutamin 9.5 g/l, Serva
Feinchemica, Heidelberg
- b) Natriumhydrogencarbonat 2.2 g/l, Serva Feinchemica,
Heidelberg

c) wahlweise Erhöhung des Glukosegehaltes von 0.1 auf
0.5% Glukose, Merck

d) wahlweise ein 10%iger Serumzusatz, Serum vom Kalb
für Gewebekultur, Serva Feinchemica, Heidelberg

Unter Vollmedium wird die Kombination a-d verstanden.

Nuclear Chicago Tissue Solubilizer (NCS), Fa. Amersham/
Searle

Nukleotide, Nukleoside und Nukleobasen

Adenin, Adenosin, 2'-Desoxyadenosin, AMP, d-AMP, ATP,
Adenosin-3,5-cyclophosphat

Guanin, Guanosin, 2'-Desoxyguanosin, 2'-d-GMP, GDP, GTP

Cytosin, Cytidin, 2'-Cytidin · HCl, 2'-d-CMP, CDP, CTP
2'-d-Thymidin, 2'-d-TTP

Uracil, Uridin, 2'-d-Uridin, UDP, UTP

Orotsäure, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin

von der Fa. E. Merck, Darmstadt

ADP, 2'-d-ATP, Adenosin-3',5'-cyclophosphat

GTP, 2'-d-GTP, 2'-d-CMP, 2'-d-CDP, 2'-d-CTP, UMP

Glukose-6-phosphat, IMP, ITP

von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH

GMP, CMP, Thymin, Inosin

von der Fa. Serva, Heidelberg

TMP, OMP

von der Fa. Sigma Chemical Company, St.Louis
Missouri

7-Methylguanosin, 7-Methylguanosin-5'-phosphat
von der Fa. P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee, Wis.
2'-d-ADP

von der Fa. ICN Pharmaceuticals, Inc., Life Sciences
Group, Cleveland, O.

Orcein Lösung

1.0 g Orcein in 55 ml Eisessig 30 Min. unter Rückfluß kochen
+ 45 ml Aqua dest. 30 Min. unter Rückfluß kochen

24 h im Dunkeln stehen lassen, filtrieren, Halbarkeit 2 Monate

Pappenheim Färbung (Grabener, 1966)

Pentobarbital Natrium, Nembutal^R, Fa. Abbot

Perchlorsäure (PCA), 5%, 6%

Phosphat Lösung, Na_2HPO_4 0.1 M, 0.2 M

Phosphat Puffer pH 7.4 in physiologischen Konzentration

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	118.4 mg
--	----------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	35.7 mg
--	---------

Aqua dest. ad	100.0 ml
---------------	----------

Physiologische Kochsalzlösung, NaCl 0.9%

Szintillationsflüssigkeit

a) auf Dioxanbasis nach Bray, 1960

b) auf Toluolbasis: PPO 12.5 g

POPOP 0.25 g

Toluol ad 2.5 l

Verschiedene Volumina der Proben wurden mit jeweils 10.0 ml
Szintillationsflüssigkeit in Kunststoff-Fläschchen überführt.

Testansatz zur Bestimmung der RNA-Polymeraseaktivität

Jeweils 0.2 μMol ATP, GTP und CTP

0.002 μMol UTP

1.0 μCi ^3H -UTP

1.5 μMol Kreatinphosphat

5 μg Kreatinkinase

0.5 μMol MnSO_4 gelöst in 10 μMol Tris-HCl, pH 7.9

1.5 μMol β -Mercaptoäthanol

10 μMol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

in 150 μl

Trichloressigsäure (TCA), 5%, 10%

Trypanblaulösung

Trypanblau 3.0 g

NaCl 0.9% at 100.0 ml

Türk'sche Lösung (Grabener, 1966)

4%iger Zusatz von Zitronensäure

Alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien und nicht besonders gekennzeichnete Chemikalien wurden in p.A. Qualität von der Firma Merck geliefert.

3. Markierte Chemikalien

Alle radiochemischen Substanzen wurden von The Radiochemical Centre, Amersham bezogen.

Substanz	spezif. Aktivität	radioaktive Konzentration	Molekular- gew.
6- ^3H -Thymin	29.4 Ci/mmol 121.0 mCi/mg	1.0 mCi/ml	242
6- ^3H Uridin	16.3 Ci/mmol 72.0 mCi/mg	1.0 mCi/ml	244
Desoxy U- ^{14}C Guanosin	485.0 mCi/mmol	25 $\mu\text{Ci/ml}$	283
5- ^3H Uridin-5- triphosphat	14.0 Ci/mmol	5.0 mCi/ml	

4. Geräte, Hilfsmittel

Dünnschicht-Chromatographie (DC) Fertigfolien Polygram^R
Cel 300 PEI/UV mit Fluoreszenz-Indikator der Fa. Macherey-
Nagel + Co., Düren (PEIZ-DC Platten)
Filterpapierrechtecke von 1.5 x 1.5 cm², Filterpapier-
bögen 4023b von der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel
Gefriertrocknungsanlage der Fa. Kniese, Marburg
Gewebekleber, Histoacryl^R blau Amp., B. Braun Melsungen AG
Mikroskopes Ortholux und Orthomat mit Panphot Photogra-
phieanlage Leitz, Wetzlar
pH-Meter PHM 61 Laboratory der Fa. Radiometer, Copenhagen
Scintillationcounter Mark I der Fa. Nuclear Chicago
UV-Lampe Desaga Uvis, Desga, Heidelberg

5. Tumormaterial

Verwendet wurden:

- a) Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (EATZ), hyperdiploide Form,
Kultur in NMRI-Mäusen, in der Ascitesform i.p. und in
der soliden Form s.c.
- b) das Yoshida Sarkom der Ratte.

6. Tiermaterial und Tierhaltung

Für die Versuche wurden verwendet:

- a) männliche Albinomäuse, NMRI-Stamm, Körpergewicht 20-35 g
- b) männliche Mäuse, C 57 black, Körpergewicht 18-22 g,
- c) männliche Albinoratten, Stamm Wistar II, Körperge-

wicht ca. 180 g

Die Tiere wurden bezogen von der Zentral-Zuchtanstalt für Versuchstierzucht, Hannover, und von der Fa. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu.

Sie wurden je nach Alter und Verträglichkeit einzeln und in Gruppen bis zu 10 Tieren in Makrolonkäfigen bei klimatisierten Stallverhältnissen und zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Zur Ernährung standen Ssniff Mäusefutter bzw. Rattenfutter der Fa. Intermast GmbH, Soest (Westf.) und Trinkwasser aus Saugflaschen ad libitum zur Verfügung. Den Tieren wurde eine Eingewöhnungszeit von mindestens fünf Tagen gewährt.

B. Methoden

1. Akute Toxizität

Die Toxizität der Testsubstanzen wurden mit Gruppen von 5-10 NMRI-Mäusen mit 23-25 g Gewicht und steigender Dosierung unter Anwendung der Regressionsgeraden bestimmt.

2. Kumulative, subakute und chronische Toxizität

Die kumulative Toxizität wurde durch eine hohe Dosierung an mehreren aufeinander folgenden Tagen, subakute und chronische Toxizität durch eine Langzeitdosierung bestimmt.

3. Beeinflussung der Vitalität von EATZ

Die Beeinflussung erfolgte durch verschieden lange Inkubation mit 10^{-3} M/l A_1 , B_1 und C in Vollmedium und anschließend i.p. Applikation von je 1.3×10^6 Zellen in NMRI-Mäuse in 5er Kollektiven. Nach 13 Tagen wurden gebildetes Ascitesvolumen und die darin enthaltene Zellzahl bestimmt.

4. Therapie des dispersen und soliden Ehrlich Ascites Tumors der NMRI-Maus

Die Therapie erfolgte an Gruppen von 10 und 20 Mäusen mit 22-38 g Gewicht nach i.p. bzw. s.c. Inokulation von 1.0-3.0 Mio. EATZ/Maus durch i.p. oder s.c. Applikation von A_1 , B_1 und C in 0.2 ml Phosphat-Lösung in verschiedenen Dosierungen, wobei für B_1 1 Tropfen Tween 20/ml zugesetzt wurde. Der

Therapieerfolg wurde durch Zählen im Peritonealexsudat enthaltener EATZ 11-12 Tage nach Inokulation, Vergleich der Überlebensraten und vergleichende Wägung der herauspräparierten soliden EA Tumoren bestimmt.

5. Herauspräparieren des soliden Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit 80 mg/kg Pento-barbital (Nembutal^R) i.p. Die Narkose wurde z.T. in der Anfangsphase mit Aether unterstützt. Die Tiere waren nach 5-10 Minuten operierbar und schliefen anschließend 4-5 Stunden. Nach einem setilich am Nacken angesetzten Längsschnitt ließ sich das Fell aufklappen. Der kugelig abgekapselte Tumor war je nach Größe mehr oder weniger mit der Rückenmuskulatur verwachsen. Der Tumor wurde möglichst komplett unter Schonung der Muskulatur durch hauptsächlich stumpfes Präparieren herausgetrennt und das Fell wieder mit Histoacryl^R Gewebekleber geschlossen. Nach der Operation wurden die Tiere getrennt gehalten, da sie sich sonst gegenseitig die Klebenaht anfressen und die Wunde so wieder aufreißt.

6. Therapie des Yoshida-Sarkoms

Zur Therapie des Yoshida-Sarkoms wurden männliche Wistar-Ratten mit ca. 180 g Gewicht in 10 er Kollektiven bei der Ascites Form im Peritoneum und in 7er Kollektiven bei der soliden Form im Nacken verwendet. Nach Einbringen von 0.7 ml

Yoshida-Zellsuspension in die Ratte erfolgte die Therapie mit B₁ und C in 1.5 ml Phosphatpuffer unter Zusatz einiger Tropfen Tween 20 i.p. vom 2.-6. bzw. 2.-11. Tag. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Überlebensraten bzw. vergleichende Wägung der soliden Tumore 12 Tage nach Tumorapplikation.

7. Bestimmung des Mitoseindex

Die Bestimmung des Mitoseindex wurde nach einer hohen (I) und einer niedrigen Dosierung (II) von A₁, B₁ und C durchgeführt. Dazu wurden 6.0×10^6 (II) EATZ NMRI-Mäusen i.p. appliziert. Sieben Tage später wurden Gruppen von 10 Tieren mit einem Mittelgewicht von 33.3 g die Testsubstanzen, gelöst in 0.2 ml 0.2 M Phosphatlösung unter Tween Zusatz (I) bzw. in 0.2 ml 0.2 M Phosphatpuffer ohne Tween Zusatz (II), nach Abnahme des Nullwertes i.p. appliziert. B₁ und C wurden äquimolar dosiert, A₁ wegen seiner höheren Toxizität in der halben äquimolaren Konzentration.

Tab. 1: Dosierungsschema zur Bestimmung des Mitoseindex

Testgruppe	Hohe Dosis (I)	Niedrige Dosis (II)
K	0.2 ml 0.9% NaCl	0.2 ml Phosphatpuffer
A ₁	125 mg/kg	62.5 mg/kg
B ₁	450 mg/kg	225 mg/kg
C	500 mg/kg	250 mg/kg

Tween 20 hält B_1 in einer Suspension, ohne Tween muß B_1 durch Rühren suspendiert und für jedes Tier einzeln aufgezogen und schnell gespritzt werden.

Jedem Tier wurden zu den einzelnen Abnahmezeiten ($t=0,2,4,8,12,24,48,72$ h) etwa 0.2 ml Ascites-Flüssigkeit aus dem Peritoneum abpunktiert. Davon wurden 3 Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht und mit 3 Tropfen Natriumcitrat 1% Lysispuffer = 1/1 verrührt und auf dem Objektträger verteilt. Nach dem Antrocknen wurde mit Essigsäure/Methanol = 1/3 fixiert und nach erneutem Trocknen mit 3-5 Tropfen einer 1%igen Orcein Lösung gefärbt (Therman, 1972). Nach etwa 5 Minuten wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Glycerin-Eiweiß umrandet, wenn die Farblösung um das Deckglas herum eingetrocknet war.

Zur Bestimmung des Mitoseindex (die Zahl der in Mitose befindlichen Zellen von 1000) wurden pro Zeitabnahme einer Testgruppe je 500 Zellen von bis zu 10 EATZellausstrichen der entsprechenden Anzahl Mäuse also bis zu 5000 EATZ pro Gruppe und Zeitabnahme ausgezählt.

Eine statistische Auswertung erfolgt durch Vergleich zeitlich verschiedener Abnahmen einer Gruppe, wobei der Ausgangswert und alle Mittelwerte, die ihn annähernd erreichen oder übertreffen zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden (M_2), und M_2 dann verglichen wird mit tiefer liegenden Mittelwerten von Zeitabnahmen unter Anwendung des t-welch bzw. t-student entsprechend dem F-Test um zu zeigen mit welcher

Signifikanz sich diese Werte von M_2 unterscheiden. M_1 ist der Mittelwert aller Zeitabnahmen einer Gruppe.

Hier gilt mein Dank der Unterstützung von B. Lingelbach, Physiologisches Institut, Marburg.

Differenziert wurde zwischen Prophase, Metaphase und der nochmals aufgegliederten ATR = Ana-, Telo- und Rekombinationsphase (Abb. 1), wobei pro Zeitabnahme einer Therapiegruppe durchschnittlich 259 Mitosezellen von 6-7 Tieren ausgezählt wurden.

8. Untersuchung der leukopoetischen Beeinflussung durch B_1 und C

Die Untersuchung erfolgte an männlichen NMRI-Mäusen mit etwa 25.0 g Gewicht.

a) Es wurde eine hohe äquimolare Dosierung i.p. täglich über 14 Tage verabreicht.

1) 0.9% NaCl, 0.2 ml

2) 150 mg/kg B_1 in 0.2 ml 0.2 M Phosphat Lösung

3) 165 mg/kg C in 0.2 ml 0.2 M Phosphat Lösung

Die Blutentnahmen waren am 2., 5., 7., 14. Tag der Behandlung und dann weiterhin am 21. und 42. Tag.

b) Über 6 Wochen erfolgte täglich eine niedrige äquitoxische Dosierung i.p. die 1/10 der DL 50 von B_1 und C entsprach.

1) 0.9% NaCl, 0.2 ml

2) 65 mg/kg B₁ in 0.2 ml 0.2 M Phosphat Lösung

3) 50 mg/kg C in 0.2 ml 0.2 M Phosphat Lösung

Die Blutentnahme erfolgte am 14., 28., 42. Tag.

Die Blutentnahme erfolgte nach der Methode von Halpern und Pacaud (1958) mit einer Pasteurpipette aus dem Venenplexus der Orbita. Dazu wird das Tier kurz mit Äther narkotisiert. Nach dem Eingriff steht die Blutung sofort wieder.

Die Technik der Blutentnahme aus dem Venenplexus der Orbita hat den Vorteil, daß man ohne Schwierigkeiten eine genügend große Blutmenge bekommt, die jedoch 0.5 cm³ nicht überschreiten sollte, und daß man reproduzierbare Werte bekommt, da man eine Beimengung von Gewebsflüssigkeit mit hohen Leukozytenkonzentrationen durch Auspressen des per Scherenschlag verkürzten Schwanzes vermeidet. Die leichte Äthernarkose dient zur Ruhigstellung des Tieres während der Blutentnahme, um eine Verletzung des Augapfels zu vermeiden. Nach 1-2 Minuten haben sich die Tiere wieder erholt. Es wurde ausschließlich das linke Auge der Tiere verwendet, deren Verhalten zeigte auch nach mehrmaliger Entnahme keine Beeinträchtigung des Sehvermögens.

Das Blut wird wegen der kurzen Gerinnungszeit schnell auf einen Objektträger ausgeblasen, ein Teil davon wird mit der Leukopipette aufgezogen, der Rest für das Differentialblutbild ausgestrichen. Zur Leukocytenzählung wird Türk'sche Lösung (Grabener, 1966) verwendet, die zur Gerinnungshemmung

einen 4%igen Zusatz an Zitronensäure enthält. Die Färbung des Ausstrichs erfolgt nach Pappenheim (Grabener, 1966), zur Differenzierung der Blutzellen wurden morphologische Beschreibungen nach Schäfer u.a. (1958) angewandt. Von jedem Tier wurden pro Abnahme 100 Leukocyten differenziert, pro Gruppe also 1000.

9. Beeinflussung der Knochenmarksstammzellen der C 57
black-Maus durch B₁

Zur Bestimmung des Einflusses von B₁ auf Knochenmarksstammzellen der C 57 black-Maus, wurden 2-4 Wochen alten Mäusen

a) 15 mg/kg B₁ i.p. täglich über 14 Tage

b) 400 mg/kg B₁ i.p. in einmaliger Dosis

appliziert. Jeweils zwei Mäusen einer Gruppe wurden am 3., 6., 14., 17. und 21. Tag unter sterilen Bedingungen Knochenmarkszellen aus dem Femur entnommen und in den Konzentrationen $10.0/7.5/5.0 \times 10^4$ Zellen/ml in 0.3% Agar-Medium (Bradley und Metcalf, 1966) inkubiert. Dazu wurden die Zellen aus dem Femur durch Durchblasen in ein Auffangmedium gespült, die Zellzahl bestimmt, pro Inkubationsansatz ein Volumen entsprechend $10.0/7.5$ bzw. 5.0×10^4 Zellen entnommen und mit Ergänzungsmedium auf 1 ml gebracht. In diesem ml ist ebenfalls 0.1 ml colony-stimulating-factor (CSF) verschiedener Konzentrationen enthalten.

CSF wird aus dem Serum der NMRI-Maus 4 h nach i.v. Injektion von 50 µg Endotoxin/Maus gewonnen. Die Herstellung des CSF-

pools erfolgt nach Metcalf (1971). Nach einer 17-tägigen Inkubationszeit bei 37° in einer 10% CO_2 enthaltenden waserdampfgesättigten Atmosphäre wurde die Zahl der Granulo- cyten- und Makrophagenkolonien ausgezählt. Kurz vor Gewinnung der Knochenmarkszellen wurde peripheres Blut abgenommen und die Leukocytenzahl bestimmt.

10. Immunitätserzeugung in NMRI-Mäusen gegen EATZ

Zur Immunitätserzeugung in NMRI-Mäusen gegen EATZ wurden

a) EATZ ($2.5 \times 10^6 - 10^7$ Zellen/ml)

ohne und mit B_1 in 10^{-3} M Lösung

in vitro in Vollmedium 2-12 h inkubiert.

Bei langen Inkubationszeiten wurde das Medium während der Inkubation ausgetauscht, das B_1 z.T. durch 2-4 minütiges Zentrifugieren bei 500-1100 g vor Applikation abgetrennt und $0.4-5.8 \times 10^6$ Zellen 19.6-44.0 g schweren Mäusen in Kollektiven von 6-10 Tieren i.p. inokuliert.

b) EATZ zur Erreichung einer 100%igen Letalität mehrfach schockgefroren. Dazu wurden $51,4 \times 10^6$ frisch isolierte EATZ in 9 ml heparinisiertem Vollmedium ohne Serum suspendiert und aus einem 37° Wasserbad 3 mal durch 15-minütiges Einbringen in ein Methanolbad von -75° C eingefroren, wobei die Temperatur der Zellsuspension auf -25° absank. Nach Abtöten der Zellen (Nachweis durch Trypanblaufärbung) wurden 2×10^6 EATZ der Ausgangssuspension entsprechend 0.7×10^6 morphologisch noch intakten Zellen in

0.35 ml 42-44 g schweren Mäusen in Kollektiven von 7 und 10 Tieren i.p. injiziert.

Bei ausreichend langer Inkubationsdauer mit B₁ bzw. nach wiederholtem Schockgefrieren bilden die Zellen keine Tumoren mehr und es konnte mit einer Zweitinkubation von 2×10^6 lebenden EATZ an den Tagen a) -1, +14, +36 und b) +14 in Bezug auf die Erstinokulation die Immunitätslage überprüft werden. Der Überwachungszeitraum nach Zweitinokulation belief sich auf 90 Tage, zu dieser Zeit noch lebende Tiere mit Tumor gehen mit diesem Wert in die Statistik ein. Die durchschnittliche Tumorausbildungszeit (DAZ), d.h. der Zeitraum bis zu einer morphologisch mit Sicherheit feststellbaren Tumorentwicklung und die durchschnittliche Überlebenszeit (DÜZ) nach Applikation vorgeschädigter Zellen alleine bzw. aktiver EATZ, wenn diese in Kombination mit vorgeschädigten EATZ verabreicht wurden, schließen die disperse und solide Tumorform ein. Die Signifikanz (α in %) einer Überlebenszeitverlängerung immunisierter Tiere mit Tumorentwicklung wird gegenüber dem jeweiligen Kontrollkollektiv bestimmt.

11. Gewinnung von EATZ und Versuchsdurchführung

Zur Markierung von EATZ wurden die Zellen 7-10 Tage nach i.p. Inokulation aus den Trägermäusen entnommen, 2 mal mit 5-10 ml 0.9%iger NaCl oder Vollmedium gewaschen und eine halbe Stunde lang vor der Markierung bei 37° im Vollmedium unter Zusatz von 0.2 ml Heparin gehalten. Nach Bestimmung der Zell-

zahl und des Anteils an toten Zellen durch Trypanblaufärbung wurden Inkubationsansätze bei 37° mit einer definierten Zahl lebender Zellen hergestellt.

Der Abbruch der Aktivitätsaufnahme in die Zelle, der Phosphorylierung und des Einbaus in den hochmolekularen Bereich sowie Abtrennen nicht aufgenommener Aktivität erfolgte durch Zentrifugieren und Waschen des Zellsediments mit 10 ml eiskalter NaCl 0.9 %

12. Herstellung eines säurelöslichen EATZellextrakts

Ein EATZellextrakt wurde hergestellt, indem eine definierte Zellzahl 2x mit eiskalter, 0.9%iger NaCl-Lösung gewaschen wurde, der Rückstand mit 4 ml kalter, 10%iger TCA 20 Min. gerührt, der Überstand nach Zentrifugieren 8 mal mit 5 ml Äther ausgeschüttelt, die wässrige Fraktion lyophilisiert, das Lyophilisat 5 mal mit 10 ml Äther extrahiert, der Rückstand in einem kleinen Volumen Aqua dest, meist 0.2 ml aufgenommen und davon 2.5-50 µl entsprechend einer bestimmten Zellzahl zur Aktivitätsbestimmung in Szintillatorflüssigkeit eingebracht wurden.

13. Bestimmung der Aktivität in EATZellextrakten

Zur Aktivitätsbestimmung der Zellextrakte wurden diese

- a) nach lyophilisieren in Dioxan-Szintillator-Flüssigkeit gezählt

- b) nach Aufbringen des TCA-Extrakts auf Filterpapier von $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ in Toluol-Szintillatorflüssigkeit gezählt.

14. Bestimmung der Aktivität im säureunlöslichen Rückstand der Zellextraktion

- a) Der säureunlösliche Zellrückstand wird 2 mal mit 5 ml kalter TCA 10% gewaschen, 30 Minuten mit 1 ml PCA 6% im siedenden Wasserbad hydrolysiert und der Überstand mit KOH 6% bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Nachdem KClO_4 in der Kälte nach 12 Stunden auskristallisiert ist, wird die Aktivität im Überstand in Dioxan-Szintillatorflüssigkeit gezählt.
- b) Der säureunlösliche Zellrückstand wird 2 mal mit 5 ml kalter TCA 10% gewaschen, das Sediment in 2 ml Aqua dest suspendiert, davon 4 x 50 μl auf 4 Filter aufgetragen und bei 50°C getrocknet, die Filter werden auf den Boden eines Zählgläschens gelegt und mit Toluol-Szintillatorflüssigkeit versetzt.
- c) Nach Inkubation der EATZ mit der markierten Substanz und Abbruch durch Einbringen des Ansatzgefäßes in Eiswasser wurden 10 mal 50 μl Medium entsprechend jeweils 0.1×10^6 EATZ mittels Eppendorfpipette auf 10 Filterblättchen gebracht und diese nach Einziehen des Mediums in 500 ml kalter TCA 10% getaucht, es wird 20 Minuten vorsichtig gerührt, um das Zellsediment nicht abzuschwemmen und der

Vorgang in weiteren 500 ml TCA wiederholt. Die Filter werden anschließend für 20 Minuten in 500 ml Äthanol/Äther = 3/1 gegeben, getrocknet und in Toluol-Szintillatorflüssigkeit gezählt.

15. Adaptieren der Szintillatorflüssigkeit

Die Aktivitätsbestimmung wurde üblicherweise durchgeführt, nachdem die Proben 12 Stunden kalt und dunkel gestanden hatten.

16. Präparation der DC-Platten

Auf den 19.75 x 20.1 cm großen Platten wurden im Abstand von 1.5 und 18.5 cm von der Unterkante Startlinie und Endlinie eines Laufs eingezeichnet (Laufstrecke 17 cm). Im Abstand von 0.7 bis 1.0 cm von den beiden Seitenkanten wurde in senkrechter Linie die Zellulose abgeschabt um ein seitliches Anziehen von Feuchtigkeit zu verhindern. Da der Fluoreszenzindikator im oberen Plattenbereich die Auftrennung von Pyrimidinbasen und -Nukleosiden störte, wurde er durch 2-3 maliges Hochziehen von Aqua dest entfernt.

17. Aufbringen von Nukleotidlösungen auf DC-Platten

Nukleotidlösungen wurden mit einer 10 µl Hamilton Syringe punktförmig mit 2-3mm Ø, Zellextrakte zur Erhöhung der Kapazität auf einer Fläche von 2 x 8 mm auf die Startlinie

von DC-Platten aufgetragen.

18. Entwicklung der DC-Platten

Zur Entwicklung der Platten wurden geschlossene, seitlich mit Filterpapier ausgekleidete Chromatographietanks (Innenraum 21 x 9 x 21 cm) verwendet, die 200 ml Fließmittel standen etwa 1.0 cm hoch, die Laufdauer beträgt ca. 2 h. Die Entwicklung erfolgte zu Beginn mit Aqua dest und NaCl verschiedener Konzentrationen, nach Standardisierung durch einen 1. Lauf mit Aqua dest und nach Trocknen der Platte durch einen 2. Lauf mit 1.5 M NaCl.

19. Aktivitätsbestimmung auf der DC-Platte

Die Bestimmung der Aktivität auf der Platte erfolgte an Hand der R_F -Werte mitlaufender kalter Kontrollnukleotide und durch Abkratzen der PEI-Zellulose und Zählen in Toluol-Szintillatorflüssigkeit.

20. Beeinflussung der enzymatischen Leberzellkernaktivität durch A_1 und B_1

Leberzellkerne von Ratten wurden nach der Methode von Chauveau et al., 1956 isoliert und in einem Testansatz zur Bestimmung der RNS-Polymerase von 150 μ l mit und ohne A_1 und B_1

a) jeweils $10^{-3}M$ und $10^{-4}M$ über 5, 10, 20 und 30 Minuten

b) jeweils 10^{-3}M über 15 Minuten mit und ohne Heparin (25 USP-E. 150 μl) bei 25° inkubiert. Nach der Inkubation wurden 120 μl jedes Ansatzes auf ein Filterblättchen pipettiert und in 5%iger eiskalter TCA präzipitiert. Nach 5-maligem Waschen mit eiskalter 5%iger TCA wurden die Filterblättchen 1 mal mit Methanol, 2 mal mit Methanol/Aceton = 1/1 und 1 mal mit Äther gewaschen (Seifart u. Benecke, 1972). Nach Lufttrocknung wurde der Einbau des markierten Nukleotids in Toluol-Szintillatorflüssigkeit gezählt. Alle Bestimmungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

21. Untersuchung der alkylierenden Eigenschaften von A_1 und B_1

- a) Zur Aufklärung der alkylierenden Eigenschaft von B_1 wurde 10^{-4}M Guanosin bei 37° über 15, 60 und 120 Min.
- a) ohne Inhibitor
 - b) mit 10^{-3}M B_1 und 10^{-3}M NaHCO_3 inkubiert.
 - c) Um eine Beeinflussung durch Eigenabsorption des B_1 auszuschließen, wurden außerdem B_1/NaHCO_3 (je 10^{-3}M) 2 h gerührt und aufgearbeitet.

Das Inkubationsvolumen beträgt jeweils 40 ml.

Die Zeitabnahmen wurden sofort eingefroren, lyophilisiert und eine Menge Lyophilisat/aq. entsprechend 50 μg Guanosin auf eine Platte aufgetragen und in 1.5 M NaCl entwickelt. Zum Vergleich wurden 0.5 μg 7-Methylguanosin

aufgetragen, eine unter UV-Licht eben noch sichtbare Menge.

- b) Die alkylierenden Eigenschaften von A_1 und B_1 wurden mit einer radiochemischen Methode überprüft, indem $10^{-4}M$ Guanosin und $0.5 \mu Ci$ ^{14}C -Guanosin mit A_1 und B_1 zuzüglich $NaHCO_3$ (jeweils $10^{-3}M$) / 4.0 ml bei 37° über 15 und 120 Min. inkubiert wurden. Die Kontrolle wurde über 2 h inkubiert und enthält kein A_1 und B_1 . Die 5 Zeitabnahmen wurden sofort eingefroren, das Lyophilisat in 0.2 ml warmem Aqua dest aufgenommen und $20 \mu l = 5.665$ mg kaltem GUO und $0.05 \mu Ci$ ^{14}C - GUO auf die Platte aufgetragen und mit 1.5 M NaCl entwickelt. Nach der Entwicklung wurde von unterhalb der Grundlinie beginnend (-0.5 bis $+ 17.5$ cm) die PEIZ in 1 cm Abständen abgekratzt und in Toluol-Szintillatorflüssigkeit gezählt.

22. Untersuchung auf cancerogene Eigenschaften von B_1 , B_3 und C

Mäusen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 29.4 g wurden über 5 Tage täglich äquimolare Dosen von B_1 , B_3 und C s.c. im Nacken verabreicht, im einzelnen 5.0, 6.3 und 5.5 mg in 0.2 ml $0.2 Na_2HPO_4$ -Lösung. Analog bekamen zwei Kontrollgruppen 0.9% NaCl bzw. $0.2 N Na_2HPO_4$ verabreicht. In bestimmten Abständen nach Erstinjektion wurde ein Kollektiv Tiere jeder Gruppe getötet, Organe makroskopisch auf pathologische Veränderungen untersucht und die Diagnose nach Fixieren von

Lunge, Milz, Leber, Nieren, Magen und Dickdarm in 4%igem Formalin, Aufarbeiten und Färben mit Hämatoxylin-Eosin mikroskopisch bestätigt und ergänzt.

Weiterhin wurden Blutkontrollen durchgeführt, um die Pathologie des Blutbildes im Sinne einer Leukopenie bzw. einer Leukämie abzuklären. Gruppengröße und Zeit bis zur morphologischen und histologischen Untersuchung nach Erstinjektion sind in einer Tabelle zusammengestellt:

	K _{NaCl}	K _{PO₄}	B ₁	B ₃	C
5 Tage	5	5	5	5	5
1 Monat	5	5	5	5	5
3 Monate	5	5	10	10	10
6 Monate	3	3	5	5	5
12 Monate	2	2	5	5	5

Die Kollektive sind relativ klein, sie waren aus arbeitstechnischen Gründen nicht größer zu halten, waren aber ausreichend, um eine starke Cancerogenität zu erfassen.

III. ERGEBNISSE

A. Therapieversuche

Zur Überprüfung von Pharmaka auf cancerotoxische Wirkung stehen heute zahlreiche Tiertumoren zur Verfügung, wobei bzgl. der Tumorgenese zwischen Transplantationstumoren, durch Chemikalien erzeugten und Spontantumoren unterschieden werden kann. Die am meisten verwendeten Tiertumoren gehören zur Klasse der Impftumoren. Sie lassen sich meist ohne große Schwierigkeiten mit hoher Angangsrate auf gesunde Tiere übertragen. Da sie relativ gleichmäßig wachsen, ist es möglich auch bei Verwendung mittelgroßer Kollektive statistisch gesicherte Ergebnisse zu bekommen. Im Gegensatz dazu bedarf es beim Arbeiten mit chemisch induzierten Tumoren eines wesentlich längeren Zeitaufwandes und auf Grund des unterschiedlichen Tumorstadiums auch einer größeren Anzahl von Versuchstieren. Spontantumoren können in ausreichender Anzahl nur bei umfangreicher Tierhaltung in ausreichendem Maße erhalten werden. Allerdings sind jedoch an ihnen erzielte Therapieerfolge meist von hoher Aussagekraft, da sie am ehesten mit Tumoren beim Menschen verglichen werden können. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden das Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus und das Yoshida-Sarkom der Ratte in disperser und solider Form als Versuchsubjekte gewählt, die beide zu den Transplantationstumoren gehören. Durch tumornahe und -ferne Applikation sollte ein Einblick

in die Pharmakokinetik der interessierenden Substanzen gewonnen werden. Weiterhin wurde geprüft, ob eine Stoßtherapie oder tägliche Dauertherapie für die neue Substanzklasse vorteilhafter ist.

A1. Bestimmung der akuten Toxizität von N-Methyl-N- β -chloräthyl -hydrazin (A_1), seinem Benzaldehydhydrazon (B_1) N'-Methyl-N'- β -chloräthyl(3.4-dimethyl-benzaldehyd)hydrazon (B_3), N'- β -chloräthyl-benzaldehydhydrazon (B_5) und N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-(4-pyridylaldehyd)-hydrazon (B_6)

Die Bestimmung erfolgte entsprechend Methode 1. Die Substanzen waren gelöst in 0.2 ml 0.2 M Phosphatlösung unter Zusatz von 1 Tropfen Tween 20/ml. Durch Anwendung der Regressionsanalyse für A_1 , B_1 und B_5 wird rechnerisch der Zusammenhang zwischen bekannten Eingaben (der Dosierung) und Ergebniswerten (Todesrate der Tiere) durch die Regressionsgerade $y = mx + b$ ermittelt, die die größte Näherung an aller Wertepaare darstellt und aus der sich die DL_{50} der betreffenden Substanz ableiten läßt.

Ausgehend von den Dosierungen 3-7 mg A_1 /Tier ergibt sich die Regressionsgerade $y = 28.46x - 95.39$. Die daraus resultierende DL_{50} beträgt 5.1 mg A_1 /Tier bzw. 193.9 mg A_1 /kg Körpergewicht. Der Tod der gestorbenen Tiere erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach der Injektion.

Tabelle 2: DL_{50} - Bestimmung von A_1

Anzahl Tiere	Tiergewicht (M)	mg A_1 / Tier	mg A_1 /kg Körpergew.	Letalrate %
5	23.3	2	85.8	0
10	24.4	3	123.0	0
10	23.7	4	168.8	10
10	24.9	5	200.8	30
10	24.8	6	241.9	90
5	28.8	6	208.3	80
5	31.0	7	225.8	100

Tabelle 3: DL_{50} - Bestimmung von B_1

Anzahl Tiere	Tiergewicht (M)	mg B_1 / Tier	mg B_1 /kg Körpergew.	Letalrate %
5	25.3	8	316.2	0
5	26.0	10	384.6	0
5	25.5	12	470.6	0
5	25.8	14	542.6	0
5	28.6	16	559.4	20
5	27.8	17	611.5	40
5	27.8	18	647.5	60

Für die Regressionsgerade ergibt sich $y = 14.86x - 211.43$. Danach beträgt die DL_{50} 17.6 mg B_1 /Tier bzw. 640 mg B_1 /kg Körpergewicht. Der Tod der gestorbenen Tiere erfolgte am 2. und 3. Tag post injectionem.

Tabelle 4: DL₅₀ - Bestimmung von B₃

Anzahl Tiere	Tiergewicht (M)	mg B ₃ / Tier	mg B ₃ /kg Körpergew.	Letalrate %
5	28.6	20	699.3	0
10	29.1	21	721.7	50
5	29.4	22	748.3	100

Die DL₅₀ beträgt 21.0 mg/Tier oder 721.7 mg/kg Körpergewicht.

Tabelle 5: DL₅₀ - Bestimmung von B₅

Anzahl Tiere	Tiergewicht (M)	mg B ₅ / Tier	mg B ₅ /kg Körpergew.	Letalrate %
5	33.5	5	149.3	0
5	32.7	10	305.8	0
5	37.0	12	324.3	0
5	33.6	14	416.7	80
5	35.6	14	393.3	20
5	32.8	15	457.3	40
5	34.8	16	459.8	100
5	35.6	16	449.4	100
5	40.3	18	446.7	100

Die Auswertung der Dosierungen 12, 14, 14, 15 und 16 mg/Tier ergibt die Regressionsgerade $y = 21.82x - 261.82$ und daraus die DL₅₀ von 14.3 mg B₅/Tier bzw. 410.9 mg B₅/kg Körpergewicht. Der Tod der Tiere erfolgte am 1. und 2. Tag post injectionem.

Tabelle 6: DL_{50} - Bestimmung von B_6

Anzahl Tiere	Tiergewicht (M)	mg B_6 / Tier	mg B_6 /kg Körpergew.	Letalrate %
5	33.9	5	147.5	40
5	33.4	10	299.4	100
5	32.5	15	461.5	100

Die DL_{50} der Substanz liegt etwa bei 5 mg B_6 /Tier entsprechend 147.5 mg/kg Körpergewicht. Wegen der hohen Toxizität der Substanz wurde darauf verzichtet, die DL_{50} genau zu bestimmen. Der Tod der Tiere erfolgte bei der Dosierung von 5 mg/Tier einen Tag nach der Applikation, bei den höheren Dosierungen erfolgte der Tod innerhalb einer Minute nach der Injektion.

Tabelle 7: Ein Toxizitätsvergleich der Substanzen ergibt die höchste Toxizität für B_6 und die geringste für B_1 .

Substanz	B_6	A_1	B_5	B_3	B_1
DL_{50} (mg/kg Körpergewicht)	0.63	1.34	1.88	2.46	2.75
MG					

Die Untersuchung der kumulativen Toxizität (Methode 2) dient der Erstellung eines geeigneten Therapieschemas. Das Ehrlich Ascites Carcinom der Maus soll mit hohen Dosen der Testsubstanzen über längere Zeit therapiert werden, die eben noch toleriert werden.

- a) Einem Kollektiv von 5 Mäusen (Mittelgewicht 27.9 g) wurde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils die halbe DL_{50} entsprechend 2.7 mg A_1 /Tier i.p. appliziert. Der Versuch zeigt die hohe Toxizität von A_1 , 4 Tiere starben am 4. Tag nach Versuchsbeginn, das 5. Tier starb am 6. Tag.
- b) In gleicher Versuchsanordnung wurde einem weiteren 5er-Kollektiv Mäusen (Mittelgewicht 28.1 g) die molar entsprechende Menge Benzaldehydhydrazon (B_1) i.p. verabreicht, also 3 x 4.35 mg/Tier, und hier überlebten alle Tiere.
- c) Für eine Dauertherapie mit B_1 wurde nun die effektive Toxizität mit einer DL_{50} von 640.0 mg/kg Körpergewicht zugrunde gelegt und an 2 bzw. 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 mg B_1 /25 g Tier entsprechend 400 mg/kg Körpergewicht Kollektiven von Mäusen i.p. appliziert, wobei den Tieren vor dem folgenden Dosierungsschub jeweils ein 3-tägiges therapiefreies Intervall gegönnt wurde.

Therapiert wurde an folgenden Tagen:

Gruppe I : Tag 1,2/6, 7/11, 12/16, 17/21, 22/26, 27/31,
32/36, 37

Gruppe II : Tag 1,2,3/7, 8,9

Als Maß für die Verträglichkeit der Dosierung diente die Gewichtsentwicklung der Tiere und die Letalrate. Die Therapie der Gruppe I wurde nach der 16. Dosierung abgebrochen, der steigende Gewichtsverlauf der Tiere zeigte eine noch tolerierbare Dosis, die Grenzdosierung wird durch zwei

tote Tiere am 33. und 50. Tag deutlich. Die Belastung durch die 3-tägige Dosierung erwies sich als so groß, sodaß diese Therapie am 12. Tag abgebrochen wurde, zumal am 5. Tag ein Tier gestorben war.

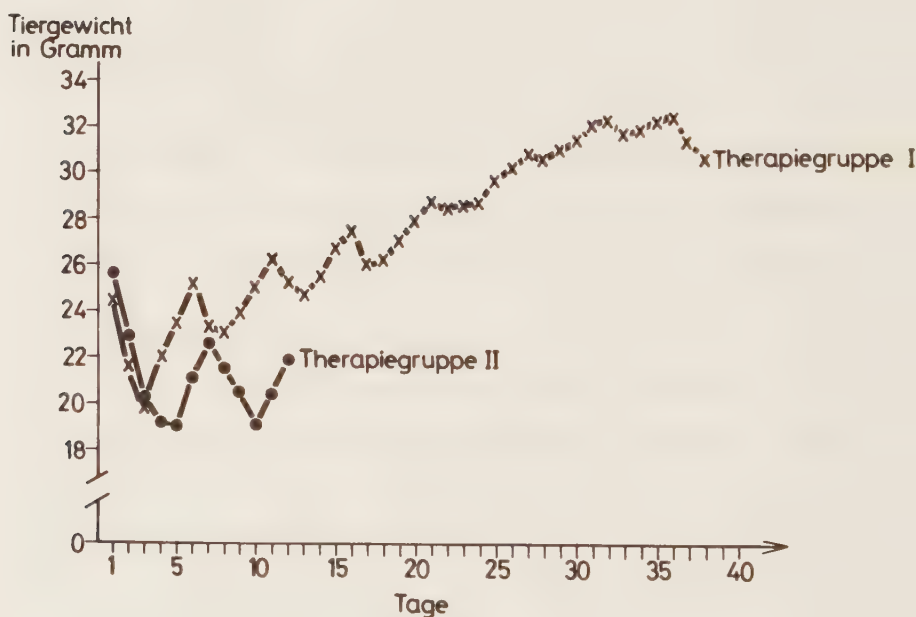


Abbildung 1: Zeitabhängiger Gewichtsverlauf ($\bar{G}$) von Mäusen unter B_1 - Dauertherapie

Um toxische Spätfolgen von A_1 und B_1 abzuklären, wurden beide Substanzen 10er Kollektiven von Mäusen in einer lange andauernden Stoßtherapie verabreicht (Methode 2). Es

wurden jeweils 10 äquimolare Dosen von 3.6mg A₁ entsprechend 128.1 mg/kg Körpergewicht und 5.8 mg B₁ entsprechend 209.4 mg/kg Körpergewicht mit dreitägigen applikationsfreien Intervallen gegeben. Die Verträglichkeit wird durch die Gewichtsverläufe charakterisiert. Am 2. Tag erfolgte die erste, am 38. Tag die letzte Applikation.

Tabelle 8: Gewichtsverläufe von Mäusen unter Langzeitapplikation von A₁ und B₁.

Tag	1	5	10	15	20	25	30	35	40	100	260
A ₁	28.1	28.9	31.1	31.6	32.6	31.9	32.3	33.0	36.1	41.1	44.0
B ₁	27.7	28.9	32.9	33.7	35.3	35.2	36.2	37.5	39.2	41.1	49.7

Tabelle 9: Subakute und chronische Toxizität unter A₁ und B₁

Tage	gestorbene Tiere		
	(Applikationszeit) 1-40	41-100	101-260
A ₁	1	0	7
B ₁	1	0	0

Einen Zeitraum von 260 Tagen überlebten 20% der mit A₁ behandelten und 90% der mit B₁ behandelten Tiere. Das Hydrazin kommt auf Grund seiner hohen chronischen Toxizität schwerlich für eine Therapie in Frage. Wegen Wurmbefalls der Tiere (*Syphatia obveleta*, *Oxyuren*) wurde auf eine

histologische Untersuchung der gestorbenen Tiere verzichtet und B₁ in einem weiteren Versuch auf chronisch toxische und cancerogene Eigenschaften untersucht.

A 2. Beeinflussung der Vitalität von EATZ in vitro durch A₁, B₁ und C.

Die Untersuchung der Vitalitätsbeeinflussung erfolgt nach Methode 3.

Tabelle 10: Entwicklung von Asciteszellen nach Inkubation mit 10^{-3} Mol/L A₁, B₁ und C.

Inkubations- zeit der EATZ (h)	Zellzahl/Tier			
	K	A ₁	B ₁	C
0.5	225x10 ⁶	170x10 ⁶	158x10 ⁶	201x10 ⁶
1	248x10 ⁶	27x10 ⁶	85x10 ⁶	244x10 ⁶
2	288x10 ⁶	0	0	160x10 ⁶

Es ist bekannt, daß Procarbazin nur in Form seiner oxidativen Abbauprodukte cytostatisch wirkt (Bollag, 1963, sowie Weitzel et al., 1964). Infolgedessen ist bei in vitro Studien ein Effekt erst nach einer gewissen Zeit zu erkennen, wenn aus der Substanz autoxidativ genügend wirksame Metaboliten entstanden sind. Nach Überimpfen der vorbehandelten Zellen konnte eine unterschiedliche Ascitesbildung festgestellt werden. Bei A₁ und B₁ ist nach einstündigem Inku-

bieren die Ascitesentwicklung deutlich gehemmt und nach 2 Stunden Inkubation makroskopisch nicht mehr sichtbar, was jedoch nicht identisch mit einem 100%igen Zelltod ist.

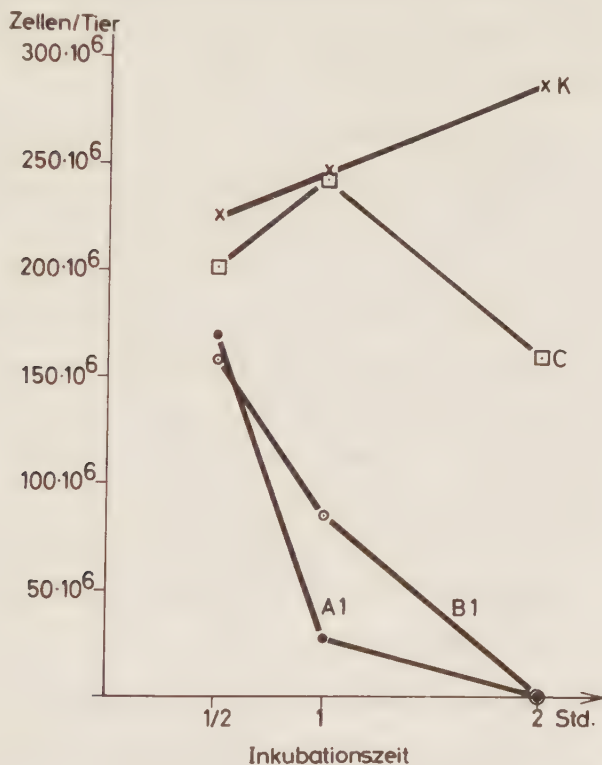


Abbildung 2: Entwicklung von Asciteszellen nach Inkubation mit 10^{-3} Mol/L A_1 , B_1 und C.

Daraus ist zu schließen, daß N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinderivate entweder als solche eine direkte Hemmwirkung auf die Tumorzellen ausüben oder wesentlich schneller als Procarbazin in die aktive Form überführt werden.

A 3. Therapie des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus und des Yoshida-Sarkoms der Ratte.

Die Therapie des Ehrlich-Ascites-Carcinoms erfolgte analog Methode 4. Die variablen Größen sind jeweils zu Beginn der einzelnen Ergebnisse aufgeführt.

- a) Kollektive von 9-10 Mäusen mit durchschnittlich 35.0 g Gewicht wurden mit 1.64×10^6 EATZ/0.2 ml/Maus i.p. inokuliert. Die Versuchsdauer betrug 11 Tage. (siehe Tab. 11, S. 39).

Bei den niedrig dosierten Dauertherapie ist die tumorferne subcutane Applikation der tumornahen intraperitonealen überlegen. Der Dauertherapie ist die höher dosierte Stoßtherapie vorzuziehen, da hier bei etwa gleichem Erfolg insgesamt weniger Substanz eingesetzt werden muß, 10.2-10.8 mg/Tier gegenüber 16.2 mg/Tier. Unter der Stoßtherapie besteht kein Unterschied zwischen den beiden Applikationsarten.

- b) Kollektiven von 10 Mäusen mit durchschnittlich 25.7 g Gewicht wurden 3.0×10^6 EATZ/0.2 ml/Maus i.p. inokuliert. Die Versuchsdauer betrug 12 Tage. (siehe Tab. 12, S.40)

Bei den eingesetzten Substanzmengen wurde von A_1 und etwa $1/3$ bzw. $3/4$ der DL_{50} ausgegangen und die Mengen molar für B_1 umgerechnet. Aus den Gewichtsverläufen kann man ersehen, daß B_1 besser verträglich ist als A_1 und daß jeweils die subcutane Applikation besser ver-

Tabelle 11: Therapievergleich zwischen niedrig dosierter Dauertherapie und hoher Stoßtherapie sowie tumornaher und tumorferner Applikation von A₁.

Dosis mg/Tier	Dosis mg/kg	%d. DL ₅₀	Dosierungs- häufigkeit	Appli- kations- art	Anfangs- G/Maus (g)	End- G/Maus (g)	EAT Zell- Zahl/Tier	% d. Kon- trolle	tumor- freie Tiere
-	NaCl	-	2.-10.Tag	i.p.	34.4	37.1	226x10 ⁶	-	2
1.8	51.4	26.5	2.-10.Tag	i.p.	35.2	34.1	113x10 ⁶	50.0	0
1.8	51.4	26.5	2.-10.Tag	s.c.	35.8	36.8	79x10 ⁶	35.0	0
3.6	102.9	52.9	3., 6., 9., Tg.	i.p.	36.0	36.3	83x10 ⁶	36.7	0
3.4	97.1	50.0	3., 6., 9., Tg.	s.c.	34.2	33.5	85x10 ⁶	37.6	0

Tabelle 12: Therapievergleich zwischen niedrig dosierter Dauertherapie und hoher

Stoßtherapie sowie tumornaher und tumorferner Applikation von A₁ und B₁.

Substanz	Dosis mg/Tier	Dosis mg/kg	% der DL ₅₀	Dosierhäufigkeit	Applikationsart	Anfangsgewicht (g)	Endgewicht/Maus (g)	EAT Zellzahl/Tier	% d. Kontrollen	tumorfreie Tiere	gestorbene Tiere
-	-	0.9 NaCl	-	2.-11 Tg.	i.p.	25.0	32.9	410x10 ⁶	-	1	3 (10.-12. Tg.)
A ₁	1.8	70.0	36.9	2.-11 Tg.	i.p.	25.5	26.1	68x10 ⁶	16.6	0	6 (10.-12. Tg.)
A ₁	1.8	70.0	36.9	2.-11 Tg.	s.c.	25.9	30.6	364x10 ⁶	88.8	0	1 (10. Tag)
A ₁	3.6	140.0	73.9	2., 5., 8., 11. Tag	i.p.	26.0	25.7	6.8x10 ⁶	1.7	1	4 (12. Tag)
A ₁	3.6	140.0	73.9	2., 5., 8., 11. Tag	s.c.	25.5	28.5	234x10 ⁶	57.0	0	4 (5., 9., 12. Tg.)
B ₁	2.9	112.8	18.9	2.-11 Tg.	i.p.	26.0	30.1	88x10 ⁶	21.5	2	3 (10. Tag)
B ₁	2.9	112.8	18.9	2.-11 Tg.	s.c.	26.1	32.9	331x10 ⁶	80.7	0	2 (11., 12. Tag)
B ₁	5.8	225.6	37.7	2., 5., 8., 11. Tag	i.p.	25.1	30.6	30.6x10 ⁶	7.5	2	5 (12., 11., 12. Tg.)
B ₁	5.8	225.6	37.7	2., 5., 8., 11. Tag	s.c.	25.9	36.1	335x10 ⁶	81.7	0	2 (12. Tag)

tragen wird.

Die intraperitoneale tumornahe Applikation ist in jedem Fall wirksamer als die subcutane tumorferne. Drückt man die Zellzahlen in % der Kontrollzellzahl aus, so ist ersichtlich, daß die Stoßtherapie der Dauertherapie vorzuziehen ist, da bei geringerer eingesetzter Substanzmenge (14.4 zu 18 mg für A₁ und 23.2 zu 29 mg für B₂ je Tier) die cytotoxische Wirkung erhöht wird.

Bei gleicher molarer Dosierung ist bei intraperitonealer Applikation A₁ seinem Hydrazon überlegen. Berücksichtigt man aber, daß in der Stoßtherapie schon 3/4 der DL₅₀ von A₁ eingesetzt wurden und daß die DL₅₀ von Hydrazon wesentlich höher liegt, so wäre eine Anwendung des Hydrazons dennoch in Betracht zu ziehen.

- c) Dieser Versuch ist ein Kontrollversuch zur Stoßtherapie von Versuch b. Die Anordnung wurde insofern variiert, als statt 4 nur 3 Applikationen verabreicht wurden und damit die Gesamtdosis um 1/4 reduziert wurde, zusätzlich wird mit einer zweiten Kontrollgruppe ein Einfluß des Lösungsvermittlers Tween 20 auf die EATZ ausgeschlossen.

Kollektiven von 10 Mäusen mit durchschnittlich 26.0 g Gewicht wurden 1.1×10^6 EATZ/0.2 ml/Maus i.p. inokuliert. Die Versuchsdauer betrug 12 Tage.

Tabelle 13: Therapievergleich zwischen tumornaher und tumorferner Applikation von A₁ und B₁ bei hoher Dosierung in Intervallen.

Substanz	Dosis mg/Tier	Dosis mg/kg	%der DL ₅₀	Dosierungs-häufigkeit Tage	Applikationsart	Anfangsgewicht Maus (g)	Endgewicht Maus (g)	EAT Zellzahl/Tier	% d. Kontrollle	tumorfreie Tiere	Tiere mit solidem Tumor
-	-	0.9% NaCl	-	2, 6, 10,	i. p.	26.5	37.8	425x10 ⁶	-	0	¹ (4, 35g)
-	-	0.9% NaCl 1 Tr. Tween 20/ml	-	2, 3, 4, 9, 10, 11,	i. p.	27.0	38.3	416x10 ⁶	97.9	0	⁴ ($\bar{x}$: 1.3g)
A ₁	3.6	138.5	72.3	2, 6, 10,	i. p.	26.5	28.4	63x10 ⁶	14.8	2	0
A ₁	3.6	138.5	72.3	2, 6, 10,	s. c.	25.8	31.5	144x10 ⁶	33.9	0	0
B ₁	5.8	223.0	36.9	2, 6, 10,	i. p.	24.5	27.7	131x10 ⁶	30.8	7	0
B ₁	5.8	223.0	36.9	2, 6, 10,	s. c.	25.8	34.3	350x10 ⁶	82.4	2	0

Die Ergebnisse bestätigen im wesentlichen Versuch b. Die Relationen der Zellzahlen unter A_1 und B_1 sowie tumor-naher und tumorferner Applikation sind analog. Die Zellzahlen in % der Kontrolle lassen A_1 als die wirkungsvoller Substanz erscheinen, jedoch muß man berücksichtigen, daß unter B_1 50 bzw. 20% mehr tumorfreie Tiere vorkommen.

Die etwas geringere Dosierung kommt bei subcutaner Applikation nicht zum Ausdruck, bei intraperitonealer Gabe werden für A_1 und B_1 schlechtere Werte erzielt, die sich etwa mit der um 25% niedrigeren Dosierung decken.

Zugesetztes Tween 20 hat keinen Einfluß auf Wachstum und Proliferation der Zellen.

- d) Da die größere therapeutische Breite von B_1 gegenüber A_1 bisher nicht ausgenutzt wurde, sollten im folgenden Versuch verschiedene Therapieschemata für B_1 zur Anwendung kommen. Die Auswertung erfolgt durch Auszählen der Ascites-Zellen, sowie durch Bestimmung der Überlebenszeit, in die auch eine Therapie mit A_1 einbezogen wurde.

Kollektiven von 10 Mäusen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 34.3 g (Kollektive 1-9) bzw. von 20 Mäusen mit durchschnittlich 28.3 g Gewicht (Kollektive 10-12) wurden 1.0×10^6 EATZ/0.2 ml/Maus i.p. inokuliert. Die Versuchsdauer bei Bestimmung der Zellzahl betrug 12 Tage.

Tab. 10. 11: Tieraktivitätsbereich, verschiedenen hoher Dosierung von B₁ durch Bestimmung von Zellzahl und durchschnittlicher Überlebenszeit (DÜZ). Vergleich äquimolarer Dosierungen von A₁ und B₁ durch DÜZ-Bestimmung.

Kollektiv-Substanz	Dosis mg/Tier	Dosis mg/kg	% d. DL ₅₀	Dosierungs-häufigkeit (Tage)	Applikations-art	Anfangs-Maus (g)	End-G/Maus (g)	EAT-Zellzahl/Tier	DÜZ (Tage)	% d. Kontrolle	tumor freie Tiere	Zahl gestor-bener Tiere
1. -	-	(0.9% NaCl)	-	2, 3, 7, 8.	i.p.	34.3	42.7	381x10 ⁶		-	0	0
2. B ₁	10	291.6	36.5	2 u. 3.	i.p.	34.0	35.7	-		0	10	0
3. B ₁	10	291.6	36.5	2 u. 3.	s.c.	33.8	43.1	372x10 ⁶		97.6	0	1 (5.Tg)
4. B ₁	10	291.6	36.5	2, 3, 7, 8.	i.p.	34.7	35.6	-		0	10	0
5. B ₁	10	291.6	36.5	2, 3, 7, 8.	s.c.	34.3	42.0	269x10 ⁶		70.6	0	0
6. -	-	(0.9% NaCl)	-	2, 3, 7, 8.	i.p.	34.6	44.0		27.9	-	0	0
7. B ₁	10	291.6	36.5	2 u. 3.	i.p.	34.8	46.7		35.3	126.5	0	0
8. B ₁	10	291.6	36.5	2, 3, 7, 8/ 12, 13, 17, 18/22, 23.	i.p.	34.4	44.0		36.9	132.3	0	1 (11.Tg)
9. B ₁	10	291.6	36.5	2, 3, 7, 8/ 12, 13, 17, 18/22, 23.	i.p.	33.8	42.2		35.0	125.5	1 (60Tg)	1 (18.Tg)
10. -	-	(0.9% NaCl)	-	2, 6, 10, 14.	i.p.	28.4	31.9		15.1	-	0	0
11. A ₁	3.6	127.2	61.0	2, 6, 10, 14.	i.p.	28.5	32.1		24.4	161.6	0	6
12. B ₁	5.8	205.0	31.1	2, 6, 10, 14, 18.	i.p.	28.1	42.7		37.4	247.7	0	0

Die Kollektive 1-5 zeigten wiederum die Überlegenheit der intraperitonealen Applikation gegenüber der subcutanen. Die subcutane Gabe hatte eine dosisabhängige Wirkung zur Folge. Der Überlebensversuch mit den Kollektiven 6-9 machte deutlich, daß mit B_1 zwar eine Teilremission gelingt - beim Eröffnen der Bauchhöhle am 12. Tag war bei allen 20 i.p. gespritzten Tieren keine Ascitesflüssigkeit zu sehen - daß jedoch noch intakte Zellen nur zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führten. Nur ein Tier ließ sich nach Überprüfung am 60. Tag als geheilt betrachten.

Die Höhe der Dosierung scheint ohne großen Einfluß auf die Verlängerung der Überlebenszeit zu sein. Zwischen der Gesamtmenge von 20 und 100 mg B_1 besteht ein zu vernachlässigender Unterschied.

Das bestätigte auch Kollektiv 12, bei dem mit 29 mg B_1 eine wesentlich größere Lebenszeitverlängerung erzielt wurde. Zieht man jedoch das Kontrollkollektiv 6 heran, so liegt die DÜZ mit 134.1 % im Bereich der beiden anderen Werte.

Die Kollektive 10-12 demonstrieren wiederum die geringere Toxizität von B_1 gegenüber A_1 durch den nur noch schwachen Gewichtszuwachs der A_1 -Tiere und deren Letalrate von 60% während der Applikationszeit.

e) Bis jetzt hatte eine tumornahe Allplikation von A₁ und B₁ zur Ascites-Peritonealflüssigkeit bessere Ergebnisse gebracht als eine tumorferne, bei der die Substanzen im Nackenbereich subcutan injiziert wurden.

Dieses Modell läßt sich insofern umkehren, als die EAT-Zellen subcutan im Nackenbereich inokuliert einen kompakten abgekapselten soliden Tumor bilden, der sich erst bei längerem Wachstum flächenmäßig ausdehnt und dann infiltrierend in die Skelettmuskulatur einwächst.

Im folgenden Versuch wirken A₁ und B₁ in verschiedenen Dosierungen auf den soliden EAT ein, indem sie einmal subcutan intratumoral und einmal intraperitoneal gegeben wurden. Die Auswertung erfolgte durch Wägen des herauspräparierten Tumors.

Es wurden 10 er Kollektive von Mäusen mit 35.3 g Gewicht verwendet, inokuliert wurden 1.0×10^6 EATZ und die Versuchsdauer betrug 22 Tage.

Das solide Ehrlich Ascites Carcinom ist insgesamt schlechter therapierbar als die disperse Form. Die intraperitoneale tumorferne Applikation ist fast ausnahmslos erfolgreicher als die in das Tumorzentrum. Die verschiedenen Applikationsformen wirken sich bei A₁ nur gering aus, die i.p. Applikation von insgesamt 34.8 mg B₁ in niedrigeren Einzeldosen ist deutlich effektiver als die 23.2 mg in 4 höheren Einzeldosen.

Tabelle 15: Therapie des soliden EAT mit A₁ und B₁ in verschiedenen Konzentrationen und Applikationsformen

Substanz	Dosis mg/Tier	Dosis mg/kg	Dosierungshäufigkeit	Applikationsart	Anfangs- G/Maus (g)	End- G/Maus (g)	Tumor G	% der Kontrolle	Zahl gestorbener Tiere
-	-	0.9% NaCl	8, 9, 14, 15/ 20, 21. Tag	s.c.	36.5	44.1	4.11	-	0
A ₁	2.7	76.5	8, 9, 14, 15/ 20, 21. Tag	s.c.	35.5	38.7	3.18	77.4	7
A ₁	2.7	76.5	8, 9, 14, 15/20, 21. Tag	i.p.	35.4	34.5	2.52	61.3	9
A ₁	3.6	102.0	8, 12, 16, 20. Tg.	s.c.	35.4	37.9	2.65	64.5	2
A ₁	3.6	102.0	8, 12, 16, 20. Tg.	i.p.	34.6	40.1	2.97	72.3	1
B ₁	4.35	123.2	8, 9, 10, 14, 15/ 16, 20, 21. Tg.	s.c.	34.9	41.7	3.92	95.4	0
B ₁	4.35	123.2	8, 9, 10, 14, 15/ 16, 20, 21. Tg.	i.p.	34.8	39.6	2.11	51.3	0
B ₁	5.8	146.3	8, 12, 16, 20. Tg.	s.c.	36.2	43.7	3.53	85.9	0
B ₁	5.8	146.3	8, 12, 16, 20. Tg.	i.p.	34.5	39.9	2.99	72.8	0

f) Die disperse und solide Form des EAT der Maus dienen in den folgenden Versuchsanordnungen dem Cytotoxizitätsvergleich zwischen dem Hydrazon (B_1) und dem strukturverwandten Procarbazin (C). Dieses wird dem Molekulargewicht entsprechend um 10% höher dosiert.

Es werden 10er Kollektive von Mäusen mit 38.6 (Kollektive 1-3), 21.9 g (Kollektive 4-6) und 29.7 g (Kollektive 7-14) verwendet. Jeweils 1.0×10^6 EATZ werden s.c. (Kollektive 1-6 und 12-14) und i.p. (Kollektive 7-11) inokuliert. Die Versuchsdauer betrug bei den Kollektiven 1-6 und 12-14 22 Tage, bei den Kollektiven 7-9 11 Tage und bei den Kollektiven 10, 11 wird die Überlebenszeit bestimmt. (siehe Tabelle 16).

Der Vergleich der Ergebnisse zeigt eine bessere Wirksamkeit des Natulans gegenüber B_1 beim soliden EAT:

60 mg B_1	-	84.6 % der Kontrolle
66 mg C	-	37.2 % der Kontrolle
78 mg B_1	-	51.8 % der Kontrolle
85.8 mg C	-	17.6 % der Kontrolle

Bei der Therapie des dispersen EAT ist B_1 zumindest ebenbürtig:

20 mg B_1 -	0% der Kontrollzellzahl	(alle Tiere tumorfrei), IIIA3d
22 mg C	- 27.0%	" (3 Tiere tumorfrei),
29 mg B_1 -	21.5%	" (2 Tiere tumorfrei), IIIA3b

Tabelle 16: Cytotoxizitätsvergleich von B₁ mit C in verschiedenen Therapieformen

Kollektiv, Substanz	Dosis mg/Tier	Dosis % d. DL ₅₀	Dosis mg/kg	Dosis % d. DL ₅₀	Dosierhäufigkeit	Applikationsart	Anfangsgewicht Maus (g)	Endgewicht Maus (g)	Düzungstage	Tumorgröße	EAT-Zellzahl/Tier	% d. Kontrolle	Zahl gestorbener Tiere	Zahl freilebender Tiere
1: -	-	0.9 % NaCl	259.1	28.8	8, 9/13, 14/18, 19. Tg.	i.p.	37.6	45.2		5.93		-	0	0
2: B ₁	10	259.1	28.8	28.8	8, 9/12, 14/18, 19. Tg.	i.p.	36.6	42.3		4.65		78.4	4	0
3: C ₁	11	285.0			8, 9/13, 14/18, 19. Tg.	i.p.	37.7	34.0		1.27		21.4	0	0
4: -	-	0.9 % NaCl	274.0	53.8	8.-20. Tg.	i.p.	22.7	36.9		3.3		-	0	0
5: B ₁	6.0	274.0	53.8	53.8	8.-20. Tg.	i.p.	22.6	25.9		1.71		51.8	1	0
6: 10	6.6	301.4			8.-20. Tg.	i.p.	20.3	18.8		0.58		17.6	4	0
7: -	-	0.9 % NaCl	370.4		2, 3/6, 7/10, 11. Tg.	i.p.	28.9	38.4			338.1x10 ⁶	-	1	0
8: G	11	370.4			2.u.3. Tg.	i.p.	29.7	33.5			91.3x10 ⁶	27.0	0	3
9: G	5.2	370.4			2.-11. Tg.	i.p.	30.0	26.5			24.3x10 ⁶	7.2	0	1
10: -	-	0.9 % NaCl	370.4		2.u.3. Tg.	i.p.	29.2	43.8	19.5			-	0	0
11: G	11	370.4			2.u.3. Tg.	i.p.	30.8	41.3	27.2			139.5	0	0
12: -	-	0.9 % NaCl	370.4		8, 9/13, 14/18, 19. Tg.	i.p.	29.9	41.4		4.71		-	0	0
13: F ₁	10	370.4	48.7	48.7	8, 9/13, 14/18, 19. Tg.	i.p.	29.3	35.9		4.27		90.7	0	0
14: C	11	370.4			8, 9/13, 14/18, 19. Tg.	i.p.	29.1	26.5		2.49		52.9	0	0

32 mg C - 2.2% der Kontrollzellzahl (1 Tier tumorfrei),

20 mg B₁ - DÜZ = 35.3 Tage IIIA3d

22 mg C - DÜZ = 27.2 Tage IIIA3d

Die Verträglichkeit von B₁ und C wird in den Gewichtsverläufen der therapierten Tiere deutlich. Die folgenden Mittelwerte beziehen sich auf 50 Tiere aus 5 Versuchen:

Kontrolle: 29.8 → 40.5 g

B₁ : 29.1 → 34.3 g

C : 29.5 → 27.9 g

Die Kontrolltiere zeigen eine Gewichtszunahme, die natürlich auch durch Tumorprogression bedingt ist, um 10.7 g, mit B₁ behandelte Tiere nehmen um 5.2 g zu, mit C behandelte Tiere dagegen um 1.6 g ab.

- f 1) Bei einigen Tieren aus Versuch III A 3 f wurde der solide Tumor nach Überimpfen operativ entfernt um zu überprüfen, ob sich der Tumor restlos entfernen läßt, ob bei längerer Überlebenszeit eine Metastasierung auftritt und ob die verschieden vorbehandelten Tiere sich bezüglich der Rezidivierung unterschiedlich verhalten. (Methode 5).

Alle Tiere überlebten die Operation und die nachfolgende Woche. Neben den 4 Rezidiven der Procarbazingruppe entwickelte 1 Tier am 20. Tag nach der Operation eine ausgedehnte nässende Entzündung am Bauch und wurde

getötet. Ein Tier starb 5 Monate nach der Operation ohne sichtbaren Tumor.

Tabelle 17: Rezidivrate und -latenzzeit nach operativer Entfernung der soliden EAT.

Tier-kollektiv	operierte Tiere	Rezidive	Rezidiv-latenzzeit (Tage)	Tumor $\bar{G}$ (g)
Kontrolle	3	3	15.7	3.3
B ₁	4	4	12.5	3.6
C	7	5	20.2	2.7

Die Tumorneubildung erfolgte ausnahmslos wieder in der Nackengegend was auf mangelhafte Ausräumung der Zellen schließen läßt. Die relativ kleinen Tumore der Natulan-Gruppe waren am abgekapselsten und damit am ehesten quantitativ zu entfernen. Dies ist auch der Grund weshalb die Procarbazingruppe die längste tumorfreie Zeit erreicht.

g) Die Therapie des Yoshida Sarkoms der Ratte (s. Methode 6).

Die therapierten Tiere waren teilnahmslos, magerten ab und besaßen ein struppiges Fell. Beim Anfassen und Hochhalten zeigten sie tonisch-klonische Krämpfe.

Das flüssige Yoshida-Sarkom bildete stark flüssigen Ascites und bis walnußgroße Tumoren an der Einstichstelle sowie kleinere Tumoren an der Leber und am Dünndarm. Aus

diesem Grund wurde die durchschnittliche Überlebenszeit und nicht die Zellzahl pro Tier bestimmt. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist B₁ dem Procarbazin überlegen.

Bei der Therapie der soliden Form des Yoshida-Sarkoms ist wie schon beim Ehrlich-Ascites-Tumor Procarbazin dem B₁ überlegen.

Tabelle 18: Therapie der flüssigen und soliden Form des Yoshida-Sarkoms der Ratte mit B₁ und C

Tumor-applikation	Substanz	Dosis mg/kg	Dosier-häufigkeit	DÜZ Inter-vall/ $\bar{x}$	Tumor-gewicht-Intervall/ $\bar{x}$	4 d. Kon-trol-le
i.p.	-	1.0ml/ 0.9%NaCl	2.-6.Tag	4-13/6.3		-
i.p.	B ₁	200	2.-6.Tag	7-15/9.2		146.0
i.p.	C	220	2.-6.Tag	3-14/7.4		117.5
s.c.	-	1.0ml/ 0.9%NaCl	2.-11.Tag		16.6-48.3/28.4	-
s.c.	B ₁	250	2.-11.Tag		9.8-23.3/14.1	49.7
s.c.	C	275	2.-11.Tag		3.0-16.5/10.2	35.9

III B Mitoseverhalten von EATZ in vivo unter A_1 , B_1 und C

III B 1. Prämisse

Ein Zellzyklus unterteilt sich in Inter- und Mitosephase (M). Die Interphase läßt sich untergliedern in prä- und postsynthetische Passage (G_1 und G_2) und die DNS-Synthese Periode (S). Mitose und Interphase unterscheiden sich hauptsächlich in morphologischer, die einzelnen Stadien der Interphase in biochemischer Hinsicht. Nach Replikation der DNS wird diese in zwei identischen Chromosomensätzen während der Mitose auf zwei Tochterzellen verteilt, was sich mikroskopisch beobachten läßt:

- 1) Prophase : nur schwach färbbare lange Chromosomen verdichten sich, es kommt zur Spindelausbildung
- 2) Metaphase : kurze, stark färbbare Chromosomen sind auf einer Äquatorialplatte angeordnet
- 3) Anaphase : alle Wanderungsstadien der Chromosomen zu den Polen
- 4) Telophase : Chromosomen an den Polen zusammengedrängt oder schon unsichtbar, die Zelle ist länglich bis fast durchgeschnürt
- 5) Rekonstruk-
tionsphase : nebeneinanderliegende komplett getrennte Zellen mit noch eben sichtbaren Chromosomen.



Abb. 3a: EATZ in der Prophase



Abb. 3b: EATZ in der Metaphase

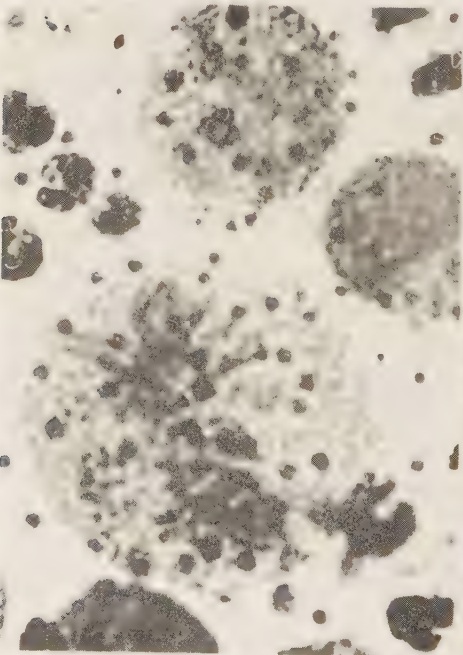


Abb. 3c: EATZ in der Metaphase



Abb. 3d: EATZ in der Anaphase

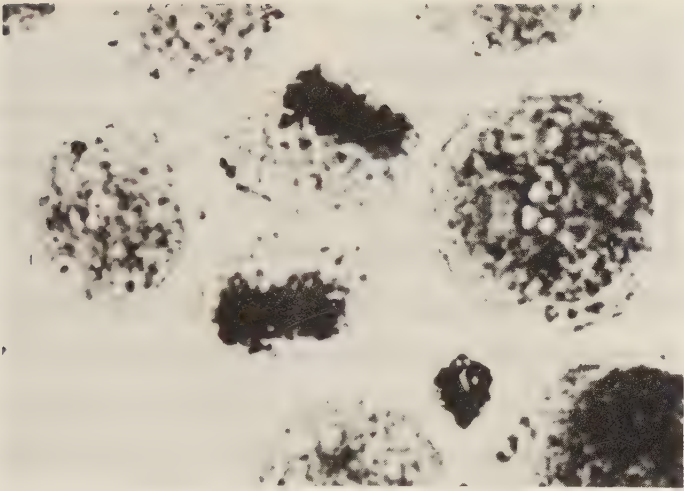


Abb. 3e: EATZ in der Telophase

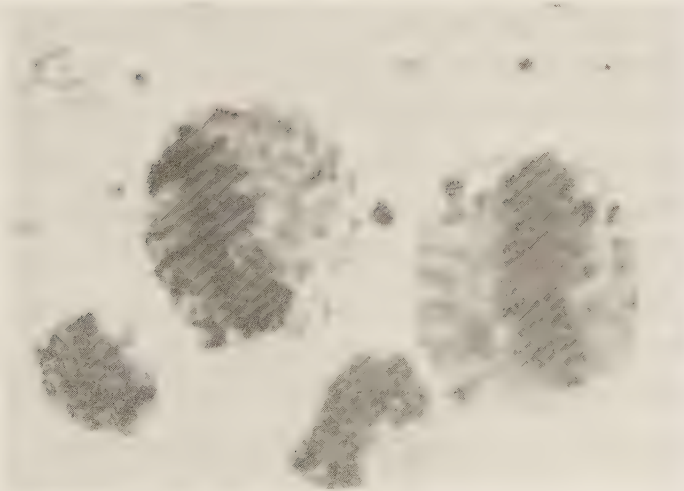


Abb. 3 f: EATZ in der Rekombinationsphase

Durch spezifische Inhibitoren lassen sich biochemische Vorgänge der Zelle blockieren und Zellkollektive synchronisieren. Man kennt etwa 30 verschiedene Kombinationen von Zelllinien und Synchronisationstechniken, die einen spezifischen Inhibitor verwenden (Mueller, 1969).

Im folgenden werden biochemische Vorgänge während des Zellzyklus und Beeinflussungsmöglichkeiten beschrieben.

Eine in Mitose befindliche Zelle ist schwer durch spezifische Inhibitoren der makromolekularen Synthese angreifbar, da hier lediglich in der Interphase synthetisierte Untereinheiten zusammengefügt werden (Petersen et al., 1969). Colchicin und Vinca Alkaloide beeinflussen Zellen in der Interphase ebenso wie Mitosezellen durch Hemmung der RNS-Synthese, Erhöhung der RNase und DPNase Aktivität, Beeinflussung des Zitronensäure- und Harnstoffzyklus und durch cytologische Veränderungen, die den Golgi-Apparat betreffen, was letztlich zu einer Arretierung der Zellen in der Metaphase führt. Colcemid behindert die Wanderung der Centriolen zu den entgegengesetzten Polen und, ebenso wie Rotenon, Antimycin A, DNP und Oligomycin die Spindelfunktion nach Ausbildung der Metaphasenplatte.

G 1: Im ersten Teil der Interphase erfolgt die biochemische Entscheidung, das Genom zu replizieren, die Initiierung der DNS-Synthese. Durch gekoppelte Transcriptions-Translations-Prozesse und Reassoziaton von großen Polyribosomen erfolgt

die Wiederaufnahme von RNS- und Proteinsynthese. Nachzuweisen sind bestimmte Enzyme wie Thymidinkinase und DNS Polymerase. Die Initierung der DNS-Synthese läßt sich verzögern, indem man in einer sehr frühen G_1 -Phase die RNS-Synthese mit Actinomycin D hemmt.

S : Wichtigste Kriterien der Synthesephase sind die Bildung von DNS und Proteinkomponenten des Chromatins.

Eine RNS von HeLa Zellen, die zur Synthese der spät replizierten DNS nötig ist, wird während der ersten beiden Stunden der S-Phase gebildet, was mit einem Actinomycin D Block nachgewiesen werden kann. Weiter erfolgt die Synthese von Cytoplasmafaktoren mit DNS-Polymerase-Aktivität und die Gen-Expression zur Histon Synthese in den Mikrosomen, die also DNS-Synthese-assoziiert ist, im Gegensatz zur Bildung kernspezifischer, nicht basischer Proteine.

Eine Beeinflussung dieser spezifischen Vorgänge erfolgt durch Thymidin oder Desoxynukleosidmonophosphate in hoher Dosierung, durch Antimetabolite wie Thymidin- und Uridinanalogue und durch Folsäureanalogue wie Aminopterin, wodurch die Verfügbarkeit von Desoxyribonukleotiden vermindert bzw. der C_1 -Stoffwechsel blockiert wird.

Puromycin und Cycloheximid greifen außer in die Proteinsynthese noch in die DNS-Synthese ein. Hydroxyharnstoff hemmt die Histonsynthese der Mikrosomenfraktion durch einen DNS-Block, MPB (2-Mercapto-pyridethyl-benzimidazol) dagegen durch einen RNS-Block.

G₂ : In der ersten Hälfte der prämitotischen G₂-Phase finden für die Mitose essentielle Transcriptionen statt, denen die entsprechenden terminalen Translationsprozesse folgen. So wird bei mehreren Zelllinien ein zum Mitoseeintritt nötiges Protein gebildet, dem 8 Minuten später ein zweites Protein folgt, das für den vollständigen Ablauf der Mitose essentiell ist.

Die Transcription und damit eine erfolgreiche Zellteilung läßt sich außer in den letzten beiden Stunden der G₂ durch Applikation von Actinomycin D hemmen. Puromycin und Cycloheximid haben den gleichen Effekt bis auf die letzte Stunde der G₂.

Durch Inhibitoren mit spezifischen Angriffspunkten ist man in der Lage Zellkollektive zu synchronisieren und Aussagen über den zeitlichen Ablauf biochemischer Vorgänge während eines Zellzyklus (Dauer bei HeLa Zellen ca. 24 h, bei EATZ ca. 40 h - Mueller, 1969) zu machen.

Durch Bestimmung des Mitoseindex, Differenzierung der einzelnen Mitosephasen und Substanzeinsatz zu definierten Zeitpunkten im Zellzyklus synchronisierter Zellen lassen sich unter Umständen Wirkungsweise und Angriffspunkt einer unbekannten, cytotoxisch wirksamen Substanz erklären. Bei multifaktoriellen Angriffspunkten läßt sich über den Mitoseindex zumindest eine Aussage über Stärke und Dauer der Cytotoxizität machen.

Im folgenden werden cytologische Untersuchungen an EATZ unter A₁, B₁ und C dargestellt, wobei Mitoseindex und Mitosephasenverteilung verglichen werden.

Bollag und Grunberg (1963) beschrieben erstmals die tumorhemmende Eigenschaft von Methylhydrazinen. Aus dieser Gruppe hat das von Zeller et al. (1963) synthetisierte Procarbazin in die Klinik Eingang gefunden, wo es inzwischen ein Standardpräparat in der Kombinationstherapie maligner lymphatischer Erkrankungen geworden ist. 1967 beschrieben Zimmermann und Schwaier die Fähigkeit von symmetrischem Dimethylhydrazin (DMH) zur Induktion von mitotischen Rekombinationen im heterozygoten diploiden Stamm D₃ von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Behandlung mit DMH steigerte die Häufigkeit der Rekombinationen um den Faktor 16 bei einer Dosis entsprechend einer Überlebenszahl von 60%.

N-Methyl-N'-benzylhydrazin (MBH) wurde von Rutishauser und Bollag 1963 und von Therman 1972 untersucht. Erstere fanden nach Einwirkung auf EATZ in vivo eine Verminderung des Mitoseindex, eine Verschiebung von der Pro- zur Metaphase, die danach dominiert, Chromatidbrüche und Rekombinationen, aber keine Chromosomenbrüche. Das Vorkommen von Chromatidbrüchen wurde von Therman an verschiedenen malignen und normalen Zelltypen nach Einwirkung einer gerade noch tolerierten Dosis MBH in vivo und in vitro studiert. In vitro behandelte Zellen - EATZ, HeLa Zellen, menschliche Lymphocyten, Mäuse-Milzzellen- zeigten keine Chromosomenbrüche. Von den

in vivo getesteten drei Mäuse- Ascites- Tumorstämmen, dem hypotetraploiden Ehrlich Tumor, 2 BF und L 1210 zeigten alle eine signifikante Anzahl von Translokationen und sporadisches Auftreten von einem oder mehreren unaufgewickelten Chromosomen in der sonst normalen Metaphasenplatte. Dagegen zeigten Mäuse- Knochenmarkszellen, Mäuse- Milzzellen sowie Wurzelzellen von *Narcissus tazetta* L. keine Chromosomenbrüche oder Translokationen.

Einige im folgenden zitierte Autoren beschreiben Chromosomenaberrationen, Absenkung des Mitoseindex und Verschiebung der Mitosephasen bei EATZ unter Procarbazin.

Zangger (1967) beschreibt dosisabhängige cytoplasmatische Veränderungen bei EATZ unter Procarbazin mit oberflächlicher Abschnürung (Oligo- Mikrostalagmose, Makrostalagmose, Stalagmoptyse) auf Grund intrazellulärer Stoffwechselschädigung.

Rutishauser und Bollag zeigten 1967, daß die Dauer der S oder G 2 Phase verlängert ist und schlossen, daß daraus die geringere Mitoserate resultiert.

Huang et al. fanden 1968 eine EAT- Zelllinie mit Resistenzentwicklung gegenüber Procarbazin. Diese Zellen sind gekennzeichnet durch zwei zusätzliche metazentrische Chromosomen als Folge von Translokationen und Konstanz des Mitoseindex. Die Resistenzentwicklung ist abhängig von einer höheren Dosis (600- 5x600 mg/kg) und dem Dosierungsschema. Bei einer

einmaligen s.c. Dosis von 200 mg/kg kommt es zu einer erhöhten Anzahl von "multinucleated giant cells", einem minimalen Mitoseindex zwischen der 4. und 8. Stunde bei einer Inhibitionsdauer bis zu 72 h.

Llombart et al. zitierten 1969 Untersuchungen über die Synthesehemmung von DNS, RNS sowie durch immunsuppressive Eigenschaften von Natulan^R und bestimmten den Dosisbereich, in dem diese Substanz Einfluß auf den Mitoseindex von EATZ hat. Es wurde eine Abhängigkeit von Dosis und Wachstumshemmung gefunden, bei der höchsten Dosis (500 mg/kg) lag das Minimum des Mitoseindex bei 12 h bei 1‰ (Kontrolle 41.7‰) und auch bei der niedrigsten Dosierung (6.25 mg/kg) war noch ein deutlicher Effekt mit 20‰ vorhanden. 18-24 h nach Applikation waren jedoch bei jeder Dosierung wieder Kontrollwerte erreicht, was auf einen reversiblen Effekt und einen schnellen Metabolismus schließen läßt.

III B 2 Mitoseindex und Verschiebung der Mitosephasen

Alle drei Hydrazinderivate hemmen die Mitose dosisabhängig. Die Ergebnisse für Procarbazin entsprechen denen der Literatur (Llombart et al., 1969 und Huang et al., 1969). Procarbazin und A₁ in hoher Dosis senken den Mitoseindex auf 4-6‰ nach 8 bzw. 4 Stunden. Der maximale Effekt bei B₁ findet sich bereits nach 2 Stunden mit 9.6‰.

Tabelle 19: Mitoseindex I, hohe Dosierung (Mitosen in ‰ und $\mathcal{L}$ in %)

t (h)	Substanz	0	2	4	8	12	24	48	72	M_1	M_2
Mi- tosen	K	24.4	28.86	32.86	33.83	22.0	29.83	27.0	27.1	28.31	29.21 (t=0-8, 24-72)
	A ₁	26.6	18.44	6.0	7.29	12.5	21.29	29.33	29.6	18.88	28.51 (t=0, 48, 72)
	B ₁	32.0	9.6	12.0	13.17	14.5	26.4	31.2	25.2	20.51	29.47 (t=0, 48, 72)
	C	37.2	21.67	5.56	4.29	8.5	28.0	26.0	28.86	20.01	37.2 (t=0)
$\mathcal{L}$	K				> 20						
	A ₁		< 10	< 0.01	< 0.01	< 5	> 20				
	B ₁		< 0.01	< 1	< 1	< 1	> 20				
	C		< 5	< 0.01	< 0.01	< 0.2	> 20	< 10	> 20		

Tabelle 20: Mitoseindex II, halbe Dosierung (Mitosen in ‰ und α in %)

t (h)	Substanz	0	2	4	8	12	24	48	72	M ₁	M ₂
Mi- tosen	K	28.4	24.22	24.89	28.29	53.25	33.14	25.5	35.0	31.59	32.64 (t=0,4-72)
	A ₁	27.33	29.4	14.89	22.0	33.11	34.89	30.89	34.33	28.36	31.66 (t=0,2,12-72)
	B ₁	29.8	22.4	26.6	32.67	34.0	37.78	29.67	40.29	31.65	34.04 (t=0,8-72)
	C	34.4	37.8	20.29	14.0	14.86	28.29	32.0	34.0	26.96	34.55 (t=0,2,48,72)
α	K		< 5								
	A ₁			< 0.01	< 10						
	B ₁		< 1	> 20							
	C			< 5	< 0.01	< 0.01	> 10				

Tabelle 21: Verteilung der Mitosephasen in %

Sub- stanz	h	1/1 Dosis				1/2 Dosis			
		Mitose- zellen/ Tiere	Pro-	Meta-	ATR- Phasen	Mitose- zellen/ Tiere	Pro-	Meta-	ATR- Phasen
K	8	320/6	40.63	50.63	8.75	210/5	39.52	41.43	19.05
	24	420/10	35.0	44.05	20.95	110/5	29.17	39.06	31.77
	48	500/10	36.00	48.00	16.00	190/4	35.26	37.37	27.37
	72	400/10	36.75	42.50	20.75				
	M		37.10	46.30	16.61		34.65	39.29	26.06
A ₁	8	180/7	21.67	59.44	18.89	210/7	37.62	38.10	24.29
	24	120/2	34.17	50.00	15.83	330/8	31.52	40.91	27.58
	48	130/2	30.00	47.69	22.31	280/7	27.14	46.07	26.79
	72	130/2	19.23	46.15	34.62				
	M		26.27	50.82	22.91		32.09	41.69	26.22
	A ₁ -K		-10.83	+ 4.52	+6.30		-2.56	+ 2.4	+0.16
B ₁	8	470/10	25.53	49.57	24.89	310/8	37.10	40.00	22.90
	24	410/10	32.68	45.61	21.71	230/7	26.52	44.35	29.13
	48	310/7	35.48	47.74	16.77	220/5	29.55	47.73	22.73
	72	350/7	25.43	50.29	24.29				
	M		29.78	18.30	21.92		31.06	44.03	24.92
	B ₁ -K		-7.32	+2.00	+5.31		-3.59	+4.74	-1.14
C	8	320/8	10.94	60.00	29.06	190/6	35.79	48.95	15.26
	24	220/6	19.55	62.27	18.18	200/6	29.00	52.00	19.00
	48	180/6	21.67	58.33	20.00	100/3	26.00	60.00	14.00
	72	140/6	18.75	56.43	25.00				
	M		17.68	59.26	23.06		30.26	53.65	16.09
	C-K		-19.42	+12.96	+6.45		-4.39	+14.36	-9.97

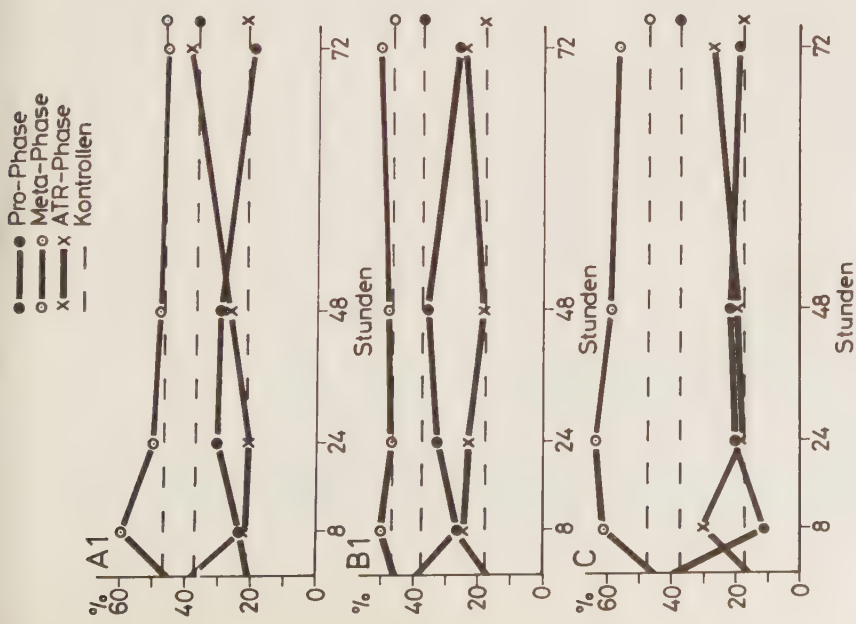


Abb. 4: Vergleich von mittleren Kontrollwerten mit dem zeitabhängigen Verhältnis zwischen Pro-, Meta- und ATR-Phasen unter der hohen Dosis A₁, B₁ und C

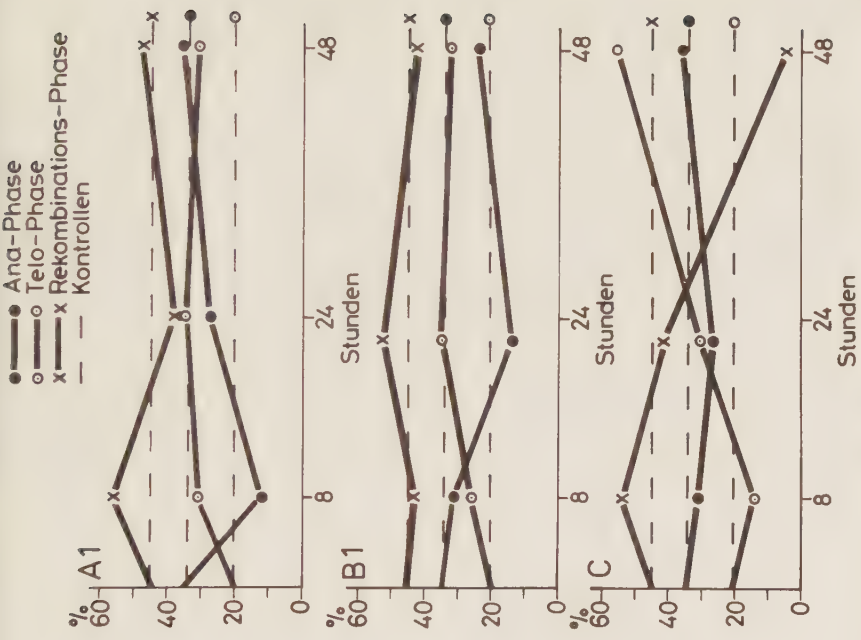


Abb. 5: Vergleich von mittleren Kontrollwerten mit dem zeitabhängigen Verhältnis zwischen Ana-, Telo- und Rekombinationsphase unter der hohen Dosis A₁, B₁ und C

Tabelle 22: Prozentuales Verhältnis zwischen Ana-, Telo- und Rekombinationsphase nach der 1/1 Dosis A₁, B₁ und C

	Kontrolle			A ₁			B ₁			C		
h	Ana-	Telo-	Rek-	Ana-	Telo-	Rek-	Ana-	Telo-	Rek-	Ana-	Telo-	Rek.-
8	35.0	17.5	47.5	11.8	31.4	56.9	31.0	25.4	43.7	31.0	13.8	55.2
24	32.8	21.3	45.9	27.5	35.2	37.4	13.4	34.3	52.2	26.3	31.6	42.2
48	34.6	23.1	42.3	36.0	17.3	46.7	24.0	32.0	44.0	35.7	57.1	7.1
M	34.1	20.6	45.2	25.1	28.0	47.0	22.8	30.6	46.6	31.0	34.2	34.8
Trend				—→			—→				←—	

Bei Anwendung der halben Dosis, die etwa der therapeutischen Dosis für das EAC der Maus entspricht, bewirken Procarbazin und A₁ nach den gleichen Zeiten wieder eine signifikante Depression des Mitoseindex ($p < 0.01$). Dagegen war der Effekt von B₁ nach 2 Stunden weniger signifikant ($p < 1$). Auffallend ist, daß B₁ schon nach 2 Stunden eine deutliche und gleichzeitig maximale Wirkung zeigt.

Unter Zusammenfassung der beiden Kontrollgruppen ergibt sich ein Verhältnis von Pro-/ Meta-/ ATR- Phasen = 35.9/ 42.8/ 21.3 und damit ein Überwiegen der Metaphase gegenüber der Prophase um etwa 7%. Rutishauser und Bollag (1963) finden dagegen bei der Differenzierung von Mitosezellen einer Kontrolle ein Phasenverhältnis von Pro-/ Meta-/ Ana- und Telophase = 55.9/ 35.9/ 8.2, also ein Überwiegen der Prophase.

Nach Gabe von 200 mg MBH/kg Maus, einem Procarbazinanalogon,

und unter Zusammenfassung der Zeitwerte 8, 24, 48, 72 h findet er jedoch eine charakteristische Verschiebung der Phasenverteilung, die mit den o. a. Werten für Natulan^R praktisch identisch ist. Auch der zeitliche Verlauf der Verschiebung stimmt gut überein.

Tabelle 23: Prozentuale Phasenverschiebung gegenüber mittleren Kontrollwerten unter 500 mg/kg Procarbazin und 250 mg/kg MBH (Rutishauser und Bollag, 1963) und unter Zusammenfassung der Zeitwerte 8,24 48 72 h

Procarbazin			N-Methyl-N'-benzylhydrazin		
Pro-	Meta-	ATR-	Pro-	Meta-	AT-Phase
-19.4	+13.0	+6.5	-22.1	+17.5	+4.6

Die unterschiedlichen Mitosephasen unter A₁, B₁ und C ergeben sich aus Tabelle 22 und Abb.4. Die Verschiebung von Pro- zu Metaphase ist unter C am größten, geringer unter A₁ und am wenigsten ausgeprägt unter B₁. Die Verschiebung ist jeweils nach 8 h am größten, was mit dem zu dieser Zeit minimalen Mitoseindex übereinstimmt. Die Metaphase gleicht sich unter A₁ und B₁ wieder der Kontrolle an, die Prophase ist bei allen 3 Substanzen nach vorübergehender Angleichung an die Kontrolle bei 72 h nochmals abgesunken. Die Rate der in Zellteilung befindlichen Zellen zeigt für alle drei Substanzen einen charakteristischen Anstieg nach 8 h und nach einem Abfall einen erneuten Wiederanstieg gegen Versuchsende.

Gliedert man Ana-, Telo- und Rekombinationsphase auf, zeigt Procarbazin ein von A₁ und B₁ abweichendes Verhalten. Eine stark angestiegene Telophase und eine stark verminderte Re-

kombinationsphase deuten bei C auf eine Behinderung des Zellteilungsvorganges hin. Demgegenüber zeigen die Zellen unter A_1 und B_1 eine reversible Verschiebung von Ana- zu Telophase.

III C Das weiße Blutbild der Maus unter Behandlung mit B_1 und C

III C 1. Prämisse

Cytostatika beeinträchtigen schnell proliferierende Gewebe wie Darmmukosa, Haarfollikel, Knochenmark und genetisches Material. Dies führt bei einer cytostatischen Behandlung in der Regel zu gastrointestinalen Störungen, Haarausfall, Leukopenien und Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit.

So beschreibt Bollag, 1968 den Einfluß von Natulan^R auf das hämopoetische System von Ratten. Es findet eine starke Hemmung der Leuko- und Thrombopoese und eine schwächere der Erythropoese. Je nach Spezies (Hund, Ratte) wird der myeloische bzw. lymphatische Anteil der weißen Blutzellen stärker beeinflusst. Bei einer täglichen Applikation von 70 mg/kg/Tag Natulan^R findet er bei der Ratte nach 6 Wochen eine Gesamtleukocyten Depression auf 13.3%, eine Lymphocyten Depression auf 5.4% und eine Neutrophilendepression auf 37.3% der Kontrolle.

Kummer und Bucher, 1965 finden bei der Behandlung des Lymphogranuloma Hodgkin, eines Reticulosarkoms und anderer Tumoren mit Natulan^R als Nebenwirkungen gastrointestinale Störungen, Leukopenien mit weniger als 1000 Zellen pro mm^3 bei 1/5, Thrombopenien unter 30.000 Zellen/ mm^3 bei 1/8 der Patienten. Leuko- und Thrombopenien traten relativ dosisunabhängig und meist gekoppelt auf, erreichten ihren Tiefpunkt durchschnitt-

lich 6-10 Tage nach Absetzen des Natulan^R und waren nach etwa 14 Tagen reversibel.

Phenylhydrazin und in geringerem Ausmaß Natulan^R führen zu einer beschleunigten Erythrocytendestruktion über oxydative Hämoglobinschädigung und zum Auftreten von Heinz'schen Innenkörpern, jedoch bei Natulan^R in vitro in einer Konzentration, die um den Faktor 20 über der Blutkonzentration während einer Therapie liegt. Bei einer täglichen Dosis von 250-300 mg in vivo ist diese Wirkung so gering, daß sie bei den untersuchten Patienten morphologisch und klinisch nicht nachweisbar war.

Im folgenden werden B₁ und C hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung auf die Leukopoese miteinander verglichen.

III C 2. Leukocytenzahl und Differentialblutbild der NMRI-Maus bei hoher und niedriger Dosierung.

Die Leukocytenwerte der Kontrolle liegen zwischen 6600 und 10200 (nach Schermer, 1954, zwischen 8000 und 11000), bei einer Abnahme bei 14200. Der Leukocytenanstieg könnte mit einer Stimulierung der Leukopoese durch die Blutentnahmen interpretiert werden. Beide Substanzen verursachen eine Leukocyten-depression, die bei Procarbazin sehr viel intensiver ist und länger andauert. Die Kontrolle zur hohen Dosierung schwankte mit einer Standartabweichung von 3397 um einen Mittelwert von 8536 Leukocyten/mm³. Unter B₁ sinken die Werte bis zum Therapieende auf 75.5-84.7% der Kontrolle, erreichen ihr Minimum eine Woche nach Therapieende mit 63.0% der Kontrolle und haben

Tabelle 24: Zeitabhängige Entwicklung der Leukocytenzahl im peripheren Blut der weißen Maus unter 14-tägiger hoher Dosierung von B₁ (150 mg/kg) und C (165 mg/kg)

Tag	3	5	7	14	21	42	51
Kontrolle							
Leuko- cyten/ cmm/ Tier	10.100	10.000	8.900	9.400	10.300	15.000	9.400
	6.300	7.800	-	-	-	-	-
	6.800	9.500	10.700	7.400	13.300	20.600	11.500
	4.800	8.100	6.500	9.800	10.900	10.200	8.000
	7.600	5.700	14.700	8.000	11.800	13.000	6.800
	7.800	3.300	7.900	6.100	7.100	8.600	6.800
	8.800	4.000	11.200	7.800	10.900	13.500	5.300
	5.500	7.500	5.700	6.800	9.400	18.400	10.400
	4.600	5.800	7.500	4.300	-	-	-
	3.600	4.800	5.900	5.200	7.900	3.200	4.900
M	6.590	6.650	8.778	7.256	10.200	14.130	7.888
S _x	2.031	2.280	2.958	1.723	2.025	4.253	2.380
B ₁							
Leuko- cyten/ cmm/ Tier	4.200	2.400	-	-	-	-	-
	5.800	4.000	3.400	3.300	4.500	9.100	-
	8.000	4.600	4.400	10.500	7.600	10.100	-
	6.300	8.200	7.200	4.900	7.900	10.700	-
	4.800	5.000	6.700	4.200	6.000	8.000	-
	4.000	5.600	7.800	5.500	5.500	-	-
	6.200	4.800	9.900	8.100	6.900	14.200	-
	5.900	3.400	6.500	5.300	6.800	-	-
	6.400	7.200	8.100	6.300	6.100	12.800	-
	4.200	5.000	10.800	2.700	6.500	7.400	-
M	5.580	5.020	7.200	5.644	6.422	10.329	-
S _x	1.269	1.698	2.357	2.423	1.047	2.476	-
C							
Leuko- cyten/ cmm/ Tier	4.800	3.800	4.100	3.300	2.000	6.900	-
	2.700	2.200	4.100	1.100	2.400	7.400	-
	2.900	3.000	1.900	2.600	2.400	7.700	-
	4.900	5.400	3.500	2.400	2.600	-	-
	3.000	2.100	4.000	3.400	2.200	4.900	-
	3.700	5.000	1.700	900	300	4.400	-
	2.400	2.500	3.600	2.500	1.400	6.400	-
	3.800	2.700	2.100	2.100	2.000	2.900	-
	3.400	600	2.300	2.100	2.000	7.100	-
	3.600	3.600	3.200	3.700	1.900	25.400	-
M	3.520	3.090	3.050	2.410	1.920	5.963	-
S _x	834	1.423	957	923	660	1.707	-

Tabelle 25: Zeitabhängige Entwicklung der Leukozytenzahl im peripheren Blut der weißen Maus unter 6-wöchiger niedriger Dosierung von B₁ (65 mg/kg) und C (50 mg/kg)

Substanz	Kontrolle			B ₁			C		
	14	28	42	14	28	42	14	28	42
Tag	13.500	16.500	10.400	7.700	10.700	5.900	4.400	5.100	2.000
Leuko- cyten/ cmm/ Tier	-	-	-	10.600	16.700	10.300	2.700	1.800	1.600
	9.500	6.600	13.000	9.300	8.900	-	3.200	3.500	2.600
	8.100	3.400	13.400	18.100	6.000	3.300	3.700	1.600	3.000
	7.600	4.900	5.700	4.100	8.800	5.600	7.200	2.700	1.900
	9.500	1.500	7.100	7.900	7.000	5.900	2.100	3.800	3.100
	12.300	11.000	11.600	6.200	4.000	6.600	3.400	3.400	1.000
	7.200	8.600	9.800	10.600	6.200	6.400	5.000	4.500	1.300
	4.600	8.000	5.800	10.100	5.600	5.600	1.200	3.000	2.200
	8.000	5.400	5.400	8.500	9.700	7.800	3.400	1.400	2.800
	8.922	7.322	9.133	9.310	8.360	6.378	3.630	3.080	2.150
M									
S _x	8.692	4.461	3.207	3.701	3.591	1.891	1.654	1.234	722

Tabelle 26: Prozentuale Leukocytdifferenzierung in Zeitabhängigkeit unter hoher Dosierung von B₁ (150 mg/kg) und C (165 mg/kg)

Tag	3	5	7	14
Substanz	Kontrolle			
Lymphocyten	82.9	83.2	93.2	86.9
Monocyten	1.7	0.7	0	0.3
Jugendl. u. stabk. neutroph. Granulocyten	0.7	0.3	0	0.7
Segmentkernige Granulocyten	14.5	15.8	6.8	12.1
Substanz	B ₁			
Lymphocyten	75.0	65.3	67.2	76.6
Monocyten	1.4	1.4	0.3	0.2
Jugendl. u. stabk. neutroph. Granulocyten	0.1	0.6	0.7	2.1
Segmentkernige Granulocyten	23.4	32.7	32.3	21.1
Substanz	C			
Lymphocyten	80.3	78.3	77.1	67.8
Monocyten	0.6	0.4	0.1	0.2
Jugendl. u. stabk. neutroph. Granulocyten	0.2	0.2	0.8	0.3
Segmentkernige Granulocyten	19.0	21.1	22.1	31.7

sich weitere drei Wochen später wieder erholt. Unter Procarbazin liegen die Werte schon am 3. Tag nach Therapiebeginn deutlich unterhalb der Kontrolle, fallen bis zum Therapieende von 53.4 auf 33.2% der Kontrolle ab, erreichen ihr Minimum ebenfalls eine Woche später mit 18.8% der Kontrolle und haben sich auch drei weitere Wochen später noch nicht vollkommen erholt.

Tabelle 27: Prozentuale Leukocyten differenzierung in Zeitabhängigkeit unter niedriger Dosierung von B₁ (65 mg/kg) und C (50 mg/kg)

Tag	14	28	42
Substanz	Kontrolle		
Lymphocyten	69.4	77.4	78.0
Monocyten	0.9	0.4	0.1
Jugendl. u. stabk. neutroph. Granulocyten	0.9	0.7	2.6
Segmentkernige Granulocyten	28.8	21.4	19.6
Substanz	B ₁		
Lymphocyten	61.1	80.6	77.4
Monocyten	0.3	0.3	1.2
Jugendl. u. stabk. neutroph. Granulocyten	1.7	0.9	1.3
Segmentkernige Granulocyten	36.7	18.2	20.0
Substanz	C		
Lymphocyten	64.8	65.9	53.6
Monocyten	0.5	1.0	1.2
Jugendl. u. stabk. neutroph. Granulocyten	0.6	0.3	3.1
Segmentkernige Granulocyten	34.1	32.8	42.4

Die Kontrolle zur niedrigen Dosierung schwankte mit einer Standardabweichung von 3492 um einen Mittelwert von 8459 Leukocyten/mm³. Auch nach sechswöchiger niedrig dosierter Dauertherapie mit B₁ weichen die Leukocytenwerte nicht wesentlich gegenüber der Kontrolle ab. Unter Procarbazin findet man wieder eine schnelle Depression, die sich nach 6 Wochen auf etwa 2000 Leukocyten/mm³ entsprechend 23.5% der Kontrolle erniedrigt.

Tabelle 28: Lymphocyten- und Granulocytenwerte unter hoher und niedriger Dosierung von B₁ und C in % von gemittelten Kontrollwerten.

Tag		3	5	7	14
B ₁ hohe Dosierung	Lymphocyten	65.7	51.5	75.9	67.9
	segmk.Granulocyten	98.4	123.7	175.3	89.8
C hohe Dosierung	Lymphocyten	44.4	38.0	36.5	25.7
	segmk.Granulocyten	50.4	49.1	50.8	57.6
Tag		14	28	42	
B ₁ niedrige Dosierung	Lymphocyten	89.3	105.7	77.5	
	segmk.Granulocyten	275.5	114.7	96.2	
C niedrige Dosierung	Lymphocyten	36.9	31.9	18.1	
	segmk.Granulocyten	93.3	75.1	68.7	

Das Procarbazin besitzt eine wesentlich höhere Knochenmarkstoxizität als das B₁, das bei der niedrigen Dosierung, die noch ein Mehrfaches der therapeutischen Dosis beträgt (Braun u. Gericke, 1977, Gericke u. Braun, 1977) offensichtlich keine Beeinträchtigung verursacht.

Im Differntialblutbild zeigt die Kontrolle folgende Verteilung:

Lymphocyten	:	81.6%, Sx : 7.6
Monocyten	:	0.6%, Sx : 0.6
Jugendl. u. Stabk. Granulocyten	:	0.8%, Sx : 0.8
Segmentkernige Granulocyten	:	17.0%, Sx : 7.1

Unter B₁ liegen bei jeder Abnahme mit Ausnahme der am 14. Tag der hohen Dosierung die Granulocytenwerte bei oder über dem mittleren Kontrollwert, wodurch der Lymphocytenabfall annähernd oder vollkommen ausgeglichen wird. Dieses Phänomen ist mög-

licherweise mit einer Knochenmarksstimulation zu erklären, ein Effekt, der als Reiz auf das Knochenmark durch die Blutentnahme zu verstehen ist oder aber dem Hydrazon zuzuschreiben ist.

Unter Procarbazin findet eine Verminderung der lymphatischen und myeloischen Blutzellen statt, woran die Lymphocyten den weitaus größeren Anteil haben.

Die Zahl der Monocyten sowie jugendlichen und stabkernigen Granulocyten erfährt durch B_1 und C keine Veränderung.

III C 3 Verhalten von Knochenmarksstammzellen der Maus (C 57 black) in vitro und in vivo nach Stimulation mit CSF unter dem Einfluß von B_1 .

Ausgehend von dem Effekt einer angestiegenen oder zumindest gleichbleibenden Leukocytenzahl unter B_1 , einer für eine cytotoxisch wirksame Substanz ungewöhnlichen Eigenschaft, wurde in einem weiteren Versuch gezielt eine Stimulation der Knochenmarksstammzellen der Maus untersucht.

Ein Kulturverfahren wurde erstmals 1961 von Till und McCulloch beschrieben, die pluripotente hämatopoetische Stammzellen in der Milz von bestrahlten Mäusen züchteten. Heute gibt es mehrere Verfahren zur Züchtung leukopoetisch und erythropoetisch determinierter Stammzellen durch die in vitro Kultur in Agar oder Methylcellulose und die Diffusionskammertechnik in vitro und in vivo. Einen Überblick über die tierexperimentellen Befunde zur Differenzierung leukopoetisch determinierter Stammzellen und ihrer induzierenden Substanzen geben Metcalf und Moore, 1971, während Gassel 1977 den Schwerpunkt

auf das humane System mit entsprechender klinischer Relevanz legt.

Die Untersuchung erfolgte nach Methode 8, sie wurde in Zusammenarbeit mit W.D. Gassel, Medizinische Poliklinik der Universität Marburg durchgeführt.

Tabelle 29: Zahl der peripheren Leukocyten/mm³ der C 57 black-Maus unter niedriger und hoher Dosierung von B₁ in vivo vor Isolierung der Knochenmarkstammzellen.

Tag	Kontrolle	einmalige hohe Dosis B ₁	niedrige Dauerdosis B ₁
0	6200 4800		
3	9000 11600	7100 4100	7100 6300
6	10400 9400	5900 9900	10400 6400
14	9500 8700	6200 6600	8800 5500
17	8500 10000		7300 7900
21	5000 4200	7800 8700	8000 4600

Bei einer nicht von der Kontrolle abweichenden Zahl der peripheren Leukocyten während und nach der Behandlung der Mäuse mit B₁ wurde das Resultat einer Knochenmarksstimulation durch B₁ bestätigt. Die Koloniezahl der Kontrolle ist von der CSF-Verdünnung und nicht von der Zahl der einge-

Tabelle 30: Bestimmung der Kolonienzahl nach Stimulierung einer unterschiedlichen Zahl Knochenmarkszellen mit einer steigenden Verdünnung von CSF. Vorbehandlung der Maus mit niedriger und hoher Dosierung von B₁

Tag		Kolonienzahl				Δ Kolonienzahl							
		Kontrolle				B ₁ hohe Dosis 1x400 mg/kg				B ₁ niedrige Dosis 14x15 mg/kg			
		1:8	1:12	1:24		1:8	1:12	1:24		1:8	1:12	1:24	
	CSF-Verdünnung												
0	100.000 Knochenmarkszellen	160	103	30									
	75.000 "	132	65	30									
	50.000 "	140	89	24									
3	100.000 "	63	29	2		+62	+30	+27	+16	+17	+6		
	75.000 "	65	33	4		+65	+23	+23	+48	+25	+3		
	50.000 "	58	85	3		+30	-55	+2	-1	-56	± 0		
6	100.000 "	104	70	42		-19	-26	-19	+73	+35	-7		
	75.000 "	97	63	29		+28	+29	+4	+40	+11	+4		
	50.000 "	99	63	27		-37	-20	-6	+24	-24	-14		
14	100.000 "	98	68	30		+33	+15	-4	+54	+21	+5		
	75.000 "	82	66	23		+12	-2	+2	+42	± 0	+4		
	50.000 "	69	55	23		+11	-1	+3	+14	-3	+7		
17	100.000 "	133	93	47					-20	+8	+9		
	75.000 "	156	84	37					-3	+6	+19		
	50.000 "	84	55	11					+51	+34	+34		
21	100.000 "	97	53	11		-11	+10	+13	+54	+41	+10		
	75.000 "	93	73	12		-21	-22	-1	+22	+20	+16		
	50.000 "	51	30	3		-14	-7	-1	+49	+4	+11		
35	100.000 "	120	72	48					-50	-18	-27		
	75.000 "	108	77	49					-14	-4	+1		
	50.000 "	114	67	31					-10	+9	-1		

setzten Knochenmarkszellen abhängig. B_1 verursacht in niedriger Konzentration eine Stimulierung der Knochenmarksstammzellen, es besteht im Vergleich zur Kontrolle ein Verhältnis zwischen Ansätzen mit erhöhter Kolonienzahl zu Ansätzen mit erniedrigter Kolonienzahl von 38:14 über 35 Tage. Die stimulierende Wirkung ist schon am 3. Tag nach Therapiebeginn vorhanden, hält bis zu einer Woche nach Applikationsende an und ist weitere 14 Tage später wieder verschwunden.

Eine einmalige hohe Dosierung von B_1 führt zu keinem Abweichen der Kolonienzahl gegenüber der Kontrolle, über 4 Abnahmen vom 3. bis 21. Tag besteht ein Verhältnis von 19:17 für Ansätze mit erhöhter Kolonienzahl, d.h. die Stimulierung der Knochenmarksstammzellen ist abhängig von der Dosierungsweise.

Das Ergebnis der Stimulation von Knochenmarksstammzellen durch Mehrfachapplikation einer niedrigen Dosis B_1 wurde in einem zweiten Versuch bestätigt.

III D Immunologisches Verhalten der Maus nach Vorbehandlung mit B₁-inkubierten und durch Schockgefrierung abgetöteten EATZ

III D 1. Prämisse

Als immunologisch kompetente Zellen sind die kleinen und großen Lymphocyten anzusehen, die man funktionell unterscheiden kann in B-Lymphocyten, die an ihrer Oberfläche Rezeptor-Immunglobuline tragen und gegen Immunogene Antikörper bilden können und T-Lymphocyten, die für die zellvermittelten spezifischen Immunreaktionen wie Transplantatabstoßung und Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ verantwortlich sind.

Die Wechselwirkung der immunologisch kompetenten Zelle mit einer Immunogen-Determinanten (einem Antigen mit spezifischer Oberflächenkonfiguration) führt zu spezifischer Toleranz, zellvermittelter Immunität, antikörperbildenden Plasmazellen oder immunologischem Gedächtnis. Als Antigen fungieren auch Transplantations-Antigene der meisten kernhaltigen Zellen von Individuen mit verschiedenartiger genetischer (heterogenetischer) Konstitution, die durch eine Immunantwort des Empfängers die Abstoßung eines Transplantats bewirken. Bei Übertragung zwischen genetisch reinen (isogenetischen) Stämmen findet eine solche Abstoßung nicht statt. Dagegen führen Tumoren als eindringende Fremdgewebe zu keiner oder einer unzureichenden Transplantatreaktion und deshalb kann man von einem immunologischen Versagen des Wirts sprechen. Dieses immunologische Versagen kann zurückgeführt werden auf 1) zu schwache Antigenität der tumorspezifischen Antigene, 2) Immun-

toleranz bei neonataler Infektion mit onkogenen Viren,
3) Immunsuppression, erzeugt durch chemische Karzinogene,
4) Immunparalyse durch extrem hohe Antigenkonzentration bei fortgeschrittenen Tumorstadien oder 5) Enhancement, wobei Antigendeterminanten durch nicht cytotoxische humorale Antikörper gebunden und maskiert werden. Spontan oder durch chemische Karzinogene entstehende Tumoren in Inzuchtstämmen lassen sich jedoch meist nicht auf andere Spezies übertragen. Die Abstoßung durch passende Antikörper und Komplementaktivierung ist wieder durch zellvermittelte Immunität bedingt. Andere Antikörper, die auch gegen Oberflächenkomponenten von Tumoren gerichtet sind, aber kein Komplement aktivieren, vermögen die Tumorzelle gegen die Einwirkung der zellvermittelten Immunität durch Maskierung antigener Determinanten zu schützen und bedingen das Enhancement-Phänomen. Marx (1974) zitiert Arbeiten, in denen das Fehlen des sog. recognition factors, eines Alphaglobulins, im Serum für das Immunversagen verantwortlich gemacht wird. Dieser Faktor wird von Lymphozyten produziert und führt zur Aktivierung von Makrophagen. Untersuchte Carcinompatienten besaßen eine sehr geringe recognition factor-Aktivität.

An dieser Stelle setzten Versuche ein, die einem Wirt Tumorzellen unterhalb einer kritischen Zellzahl, lebende, aber nicht mehr vermehrungsfähige, mit veränderter Oberflächenstruktur, abgetötete oder Tumorzellen, die an starke immunogene Fremdproteine gekoppelt sind, applizieren bzw. sie auf erwachsene allogene Individuen transplantieren und damit Immunität bzw. eine Reaktion im Sinne des Enhancement-Phänomens ver-

mitteln.

Diese Versuche wurden von Membranstudien begleitet und auf Grund von Ergebnissen über eine hohe Geschwindigkeit für die Bewegungen von Lipiden und Proteinen in biologischen Membranen kann man heute nicht mehr von hochgeordneten statischen Strukturen, sondern muß von der Fluidität der Membran ausgehen (Lee, 1969).

Aus einer veränderten Zelloberfläche einer Tumorzelle wird ein gestörter funktioneller Kontakt abgeleitet, der Faktoren ausschaltet, die sonst die Hemmung der DNS-Synthese und der Proliferation einleiten und der zum Verlust der Kontakthemmung führt (Emmelot, 1973). Man hat auch einen entsprechenden Zusammenhang gefunden zwischen der Menge des unvollständigen Glykolipids, dem die Sialinsäure fehlt, und dem Ansprechen einer Zelle auf die Kontaktinhibition (Jäckh, 1976).

Die Veränderung des Membranzustandes und als Folge die mitotische Teilung werden auch von Ferber und Resch, 1976 bei der Lymphozytenaktivierung beschrieben. Nach Bindung von polyklonalen Liganden wie Concanavalin A an Oberflächenrezeptoren durchlaufen die Lymphozyten eine charakteristische Sequenz biochemischer Veränderungen, die in B (Antikörper sezernierende Zellen) und T-Lymphozyten (antigensensitive Zellen, die Funktionen der zellulären Immunität ausüben oder die Antikörpersynthese regulieren) gleich ist. Es kommt zu Rezeptoraggregaten durch mehrwertige Liganden. Nicht an Rezeptormoleküle gebundene Membrananteile werden fluider, die Permeabilität für Zucker, Aminosäuren, Nukleoside und Ionen wie Ca^{++} steigt, membrangebundene Enzyme werden aktiviert, so auch die

Lysolecithin-Acyltransferase, die bevorzugt hochungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure und Arachidonsäure in die Position 2 des Lecithinmoleküls der Phospholipide einbaut. Ähnlich wie die Zunahme von Lysophosphatiden führt die Erhöhung der Ungesättigtheit zu einer fluideren Phospholipidphase. Nach etwa 1-2 Stunden kommt es zu einer gesteigerten RNA- und Proteinsynthese, nach einigen weiteren Stunden vergrößert sich die aktivierte Zelle, Lysosomen und Mitochondrien werden vermehrt gebildet (Blast-Transformation), nach etwa 36 Stunden folgt die DNS-Synthese und nach etwa 3 Tagen teilt sich der Lymphozyt.

Sialinsäure ist als Baustein der prosthetischen Gruppe vieler Glykoproteine im Organismus weit verbreitet.

Ihre Rezeptorfunktion wies van Heyningen 1974 nach indem er zeigte, daß Tetanus Toxin und Serotonin von zwei verschiedenen sialidase-labilen Disialosylgangliosiden, Cholera Toxin dagegen von einem sialidase-stabilen Monosialosylgangliosid gebunden werden.

Durch Neuraminidasen werden Kryptantigene auf Erythrozyten (T-Agglutinine) und auf der Intima von Nierenkapillaren freigelegt, die mit T-Agglutininen im menschlichen Serum (Antikörpern) reagieren. Menschliche Lymphozyten binden nach Neuraminidasebehandlung in erhöhtem Maße Schafererythrozyten (Rosettenbildung), Immunglobuline und Komplementfaktoren. Durch Sialinsäureabspaltung aus der Oberfläche bestimmter Tumorzellen werden diese stärker immunogen durch Demaskierung tumorspezifischer Transplantationsantigene. An Tiermodellen konnte gezeigt werden, daß nach Entfernung eines Tumoranteils,

mechanischer Zerkleinerung, in vitro Behandlung mit Neuraminidase und Reapplikation der Suspension die so behandelten Tiere eine verlängerte Lebensrate und vermindertes Tumorstadium aufwiesen. Auch bei menschlichen Leukämiepatienten konnten mit dem gleichen Verfahren Erfolge erzielt werden (Behringwerke, 1974).

Auch Schauer konnte 1971 zeigen, daß durch Abspalten der Neuraminsäure die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Mäuse-Tumorzellen in Gewebe-Kulturen wesentlich vermindert wird. Acylneuraminsäuren der Zellmembranen vermindern die immunochemischen Reaktionen von gesunden sowie von carcinomatös entarteten Zellen.

Dagegen fanden Froese et al., 1974 ein gesteigertes Tumorstadium, wenn sie mit Röntgenstrahlen und Neuraminidase vorbehandelte und in einer folgenden Inokulation unbehandelte lebende B 16-Melanomzellen Mäusen inokulierten.

Neben Versuchen, Membran und Antigenität von Tumorzellen zu verändern wurden auch unspezifische Immunstimulantien eingesetzt. BCG (bacillus Calmette-Guérin) Tuberkulose Impfstoff wird als unspezifischer Stimulator des Immunsystems angesehen und hat in lokaler Applikation bei Melanom-Patienten Remissionen bewirkt. Nebenwirkungen sind Überempfindlichkeitsreaktionen mit z.T. tödlichem Ausgang. Die Wirkungsweise soll in einer Aktivierung der Makrophagen bestehen (Marx, 1974).

Eine virale Tumorthherapie durch den onkolytischen Effekt zytotoxischer Viren gelang bei bestimmten Mäusestämmen, wobei durch intraperitoneale Injektion von Influenza- und

Reoviren die zum Teil vollständige Onkolyse von Ehrlich-Ascites-Karzinomen gelang. Die überlebenden Mäuse zeigten eine ungewöhnlich starke postonkolytische Immunität gegenüber Ehrlich-Karzinom-Zellen (Trepel, 1971).

Daß Ehrlich-Ascites-Tumorzellen antigene Strukturen besitzen, schlossen Hartveit und Halleraker, 1971 aus der entzündlichen Reaktion der Maus auf eine s.c. EATZ-Implantation, die sich in Ödemen, Granulozyteninfiltration und Tumorzellnekrose im Transplantatzentrum äußert. Die mangelhafte Immunantwort erklären sie analog Thunold (1968) durch den Schutz der Zellen durch Immunglobulin vom vorhergehenden Wirt auf ihrer Oberfläche. Die Zellen werden in einem entzündlichen Exsudat lysiert, wenn bei der i.p. Transplantation Komplement verfügbar ist.

1967 konnte Thunold Immunität gegen s.c. und i.p. applizierte EATZ erzeugen, indem er den Tumor in den Schwanz injizierte und später wieder entfernte. Den größten inhibitorischen Effekt fand er bei subcutaner Zweittransplantation, bei intraperitonealer Implantation erfolgte Wachstumshemmung, aber eine Anreicherung an entzündlichem Exsudat, welches die Maus tötete. Mit der gleichen Immunisierungsmethode fand er in einer späteren Arbeit (1968) eine größere Lymphozytenaggregation an EATZ bei immunisierten Tieren und bei diesen Tieren ein gleichbleibendes Milzgewicht, wohingegen nicht vorbehandelte Tiere nach EATZ-Gabe ihre Milz vergrößern.

Aktive Immunität gegenüber Methylcholanthren-Tumoren in Mäusen konnte erzeugt werden, indem die Tiere mit diesen be-

strahlten, noch lebenden Tumorzellen induziert wurden, sogar wenn die Zellen in Millipore-Kammern eingebracht wurden.

Die Überlebenszeit von Mäusen gegenüber Kontrollen konnte verlängert werden, wenn mehrere Tage vor bis 4 Tage nach Transplantation isogenetischer L 1210 Leukämie gleiche, bestrahlte Zellen appliziert wurden (Baker, Taub, 1973).

Die Bedeutung des Zeitfaktors für die Immunitätsentwicklung wird in einem Artikel von Gershon und Kondo 1971 herausgestellt. Sie fanden an Hamster-Lymphom-Allotransplantaten bei Verwendung von splenektomierten Hamstern, daß eine bestimmte Zeit der fortgesetzten Tumorentwicklung für eine Immunantwort notwendig ist. Wird innerhalb dieser Zeit, die um so kürzer ist, je höher die inokulierte Zellzahl ist, der Primärtumor entfernt und zeitversetzt ein weiterer Tumor implantiert, so kommt es jetzt zu gesteigertem Tumorwachstum und Metastasierung durch gesteigerte Produktion von wachstumssteigernden Antikörpern. Die kritische Grenze liegt bei 10^7 bis 5×10^7 inokulierten Zellen bei einem Tumorverbleib von 7 Tagen. Der zelluläre Immunmechanismus kann jedoch aufrecht erhalten werden, wenn nach Tumorexcision innerhalb der kritischen Zeit sofort eine Zweitinokulation erfolgt. Dies ist schon daraus ersichtlich, daß keines der Tiere nach der Reinokulation einen Tumor entwickelte.

Eine aktive Immunisierung und Immuntherapie gelang Wacker et al., 1976 mit entkernten Ehrlich-Ascites-Carcinom-Zellen bei NMRI-Mäusen. Zur Immunisierung erhielten die Tiere 5×10^6 EAT-Cytoplasten i.p., zur Tumorerzeugung 5×10^5 EATZ i.p.

Nach Cytoplastenprophylaxe und EATZ-Applikation 2 bzw. 20 Tage später wurde eine Rate von 80 bzw. 100% tumorfreien Tieren erhalten. Mit einer Cytoplastentherapie an den Tagen +1, +2 sowie +2, +4 nach EATZ-Inokulation wurden Raten von 35 bzw. 0% tumorfreien Tieren erhalten. Alle immunisierten Tiere überstanden weitere Tumorverabreichungen nach 40, 80 oder 120 Tagen erfolgreich, letzteres nicht in Übereinstimmung mit Shohat, was aber lediglich zeigt, daß die Dauer der Immunität von der Immunisierungsmethode abhängig ist. Eine Immunisierung mit EAT-Cytoplasten ist möglich, eine Therapie dagegen nur bedingt.

Neben der Immunstimulation mit zeitlich begrenzt eingesetzten Tumortransplantaten und vorgeschädigten Tumorzellen hat man versucht, eine erzeugte Immunität auf ein anderes Individuum zu übertragen.

Baldwin zitiert 1973 Angaben, nach denen Immunität gegen MC-induzierte Sarkome durch Milzzellen tumortragender Mäuse übertragen werden kann, wenn das Intervall zwischen Inokulation von 10^5 MC-Sarkomzellen und Milztransfer wenigstens 7 Tage betragen hat.

Nordlund und Gershon untersuchten 1974 den Einfluß der Milz auf das Wachstum von Cloudman-Melanom (S.91) Zellen in Mäusen. Bei Applikation von 2.5×10^6 Zellen fanden sie ein schnelleres Wachstum bei normalen Tieren, bei Inokulation von 8×10^5 Zellen dagegen fanden sie ein schnelleres Wachstum bei splenektomierten Zellen. Sie postulierten daraufhin zwei Regulationsweisen der Milz bei einer Immunantwort, einmal durch Produktion von "enhancing antibodies" und zweitens durch Produktion der

Suppressor T-Zellen, was dazu führt, daß die Milz bei einer hohen Zellzahl die Immunantwort unterdrückt.

Mit Withaferin A, einem Steroidlacton aus *Withania Somnifera* Dun, konnten Shohat und Joshua 1971 das Ehrlich-Ascites-Carcinom bei Mäusen innerhalb 3-4 Tagen heilen und gleichzeitig eine bis zu 2 Monate anhaltende Immunität gegen EATZ erzeugen. Die Immunität bestand 14 Tage nach Erstinokulation und Heilung innerhalb 4 Tagen zu 100%, bis zu 4 Wochen zu 50% und nach 7 Wochen zu 13%. Im Peritonealexsudat waren während der kurzen Heilungsphase und nach EATZ-Reinjektion in immunisierte Mäuse "giant cells" und eine auffallende Proliferation von Makrophagen, die sich an die Ascites-Zellen anhefteten, zu sehen, während die Lymphozyten- und Granulozytenzahl der Kontrolle gegenüber unverändert blieb. Die Immunität konnte durch Serum oder Peritonealzellen, aber nicht durch Milzzellen auf andere Mäuse übertragen werden. Humorale Antikörper wurden im Blut immunisierter Mäuse nachgewiesen. Eine Immunitätserzeugung durch hoch bestrahlte und Jodacetat-behandelte EATZ wird zitiert.

III D 2. Bestimmung der Angangsraten von EATZ bei der Maus
in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit B₁

Im folgenden immunologischen Versuch sollte untersucht werden, ob EATZ nach einer in vitro Inkubation mit B₁ soweit geschädigt werden können, daß sie zwar noch einige Zeit lang lebensfähig aber vermehrungsunfähig sind. Die akute Cytotoxizität wurde jeweils durch eine Trypanblaufärbung bestimmt. Die zweite Frage war, ob und in welchem Ausmaß diese vorgeschädigten Zellen Immunität in NMRI-Mäusen erzeugen können. Diese Fragestellung war auch deshalb interessant, weil auf Grund mehrerer Versuche eine Membranveränderung durch das Hydrazon anzunehmen war, wodurch möglicherweise die Antigenität der Ascites-Zellen verändert werden könnte. Die Versuche hatten ergeben

- 1) einen erhöhten Oberflächen-SH-Spiegel
- 2) eine erhöhte Nitrophenylphosphataseaktivität
- 3) eine erhöhte Aufnahme von Aminoisobuttersäure
- 4) eine erhöhte Glykolyse
- 5) und eine verminderte Aufnahme von Uridin und Thymidin in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter Hydrazoneinwirkung in vitro. (1-4, Hefter, 1977, 5, Braun et al., 1976 a)

Der Versuch zeigt, daß eine Erhöhung der inokulierten Zellzahl von 2 auf 5×10^6 /Tier keinen Einfluß auf die Überlebenszeit der Mäuse (mittleres Ausgangsgewicht 29.1 g) hat. Bei einer Inkubationszeit von 3 Stunden besteht bei den beiden B₁-Gruppen eine Verlängerung der Überlebenszeit von über 30%, was dazu Anlaß gibt, die EATZ über noch längere Zeit dem Hydrazon auszusetzen.

Tabelle 31: Bestimmung der DÜZ von Mäusen nach Inokulation von unterschiedlich lange mit B_1 inkubierten EATZ (Methode 10a)

Inkubationsdauer in h	Konz. B_1	applizierte EATZ/Totzahl in % nach waschen	Tumortiere/Gesamtzahl	DAZ in Tagen	DÜZ in Tagen
2	-	2×10^6 / 2	7/7	7.9	18.3
2	-	5×10^6 / 2	7/7	8.1	16.6
3	-	2×10^6 / 6	7/7	10.4	23.0
3	-	5×10^6 / 6	7/7	9.6	18.3
2	$10^{-3}M$	2×10^6 / 8	7/7	9.6	18.7
2	$10^{-3}M$	5×10^6 / 8	7/7	8.1	17.7
3	$10^{-3}M$	2×10^6 / 15	6/7	17.0	26.7
3	$10^{-3}M$	5×10^6 / 15	7/7	19.1	28.4

Tabelle 32: Bestimmung der DÜZ von Mäusen nach Inokulation von unterschiedlich lange mit B_1 inkubierten EATZ (Methode 10)

Versuchsdauer (h)/Inkubationsdauer (h)	Konz. B_1	EATZ-Totzahl in %	Tumortiere/Gesamtzahl	DAZ in Tagen	DÜZ in Tagen
4/4	-	16	7/7	8.4	13.1
4/3:10	$10^{-3}M$	28	7/7	8.7	14.1
5/5	-	23	7/7	7.9	11.4
5/3:45	$10^{-3}M$	29	7/7+	10.0	12.7
6/6	-	24	7/7	8.7	13.6
6/4:45	$10^{-3}M$	33	7/7	12.1	15.9
7/7	-	17	7/7	8.1	11.7
7/5:20	$10^{-3}M$	19	7/7	12.9	19.0

+ Ein Tier mit solider Tumorentwicklung am 34. Tag wurde nicht gewertet.

Um während der verlängerten Inkubationszeit den Zellen (10^7 Zellen/ml) gleiche Bedingungen zu bieten und ein Absinken des pH durch die Glykolyse der EATZ zu vermeiden, wurde das Medium jeweils nach 2, 4 und 6 Stunden sowie vor der Inokulation von 5×10^6 EATZ/Maus durch zweimaliges Waschen erneuert. Nach dem Waschen wurde B_1 in entsprechender Konzentration wieder zugesetzt, wegen der Unterbrechung der Inkubation durch den Waschvorgang werden Versuchsdauer und Inkubationsdauer getrennt aufgeführt.

Die Tendenz einer längeren Überlebenszeit der mit B_1 inkubierten EATZ behandelten Mäuse (mittleres Ausgangsgewicht 20.3 g) bleibt erhalten, jedoch ist die Inkubationszeit offensichtlich noch zu kurz, um Tumorfreiheit zu erreichen und wird im nächsten Versuch weiter verlängert.

Da die mit B_1 inkubierte Zelle während der 25 Minuten des intraexperimentalen Waschvorganges möglicherweise Gelegenheit hat, Membrandefekte zu reparieren (Löffler, 1974), wurde das Mediumvolumen auf 2.5×10^6 Zellen/ml erhöht, um eine kontinuierliche Einwirkungszeit zu ermöglichen. Vor der Inokulation wurde durch Zentrifugieren der Zellsuspension und Abpipettieren des Überstandes das Volumen auf $1/4$ eingeengt. Da das Hydrazon in Untersuchungen von Gericke und Braun, 1976, stark immunsuppressive Eigenschaften gezeigt hatte, wurden ungewaschene und zur Kontrolle zweifach in Vollmedium gewaschene Zellen inokuliert ($5 \times 10^6 / 0.5$ ml), um eine Immunitätsveränderung durch mitgespritztes Hydrazon zu untersuchen. Der Überwachungszeitraum betrug bis zum Ableben des letzten Tieres mit Tumorentwicklung 67 Tage.

Tabelle 33: Bestimmung der DÜZ von Mäusen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der EATZ und der Applikation gewaschener (gew.) und ungewaschener EATZ (Methode 10a)

Gruppe	Inku- bations- dauer (h)	Applizierte EATZ/EATZ- Totzahl (%)	Tiere mit flüssigem Tumor/ Tiere mit solidem Tumor/ eingesetzte Tiere/ am 43.Tag tumor- freie Tiere	DAZ in Tagen	DÜZ in Tagen
K	1	5.0×10^6 / 2	7 / 0 / 7 / 0	13.4	24.4
B ₁	1	4.0×10^6 / 4	7 / 0 / 7 / 0	9.3	16.9
K	2	4.0×10^6 / 3	7 / 0 / 7 / 0	7.6	14.3
B ₁	2	3.6×10^6 / 3	7 / 0 / 7 / 0	8.4	16.7
K	4	5.0×10^6 / 1	7 / 0 / 7 / 0	7.9	15.7
K _{gew.}	4	3.7×10^6 / 3	7 / 0 / 7 / 0	8.1	14.6
B ₁	4	2.6×10^6 / 21	7 / 1 / 7 / 0	10.4	19.4
B _{1 gew.}	4	4.6×10^6 / 14	7 / 0 / 7 / 0	10.1	16.9
K	7	5.0×10^6 / 46	7 / 0 / 7 / 0	10.3	19.4
K _{gew.}	7	5.0×10^6 / 19	7 / 0 / 7 / 0	9.0	15.0
B ₁	7	5.8×10^6 / 31	4 / 1 / 6 / 1	28.6	43.0
B _{1 gew.}	7	2.3×10^6 / 32	4 / 0 / 7 / 3	28.5	35.3
K	10	5.5×10^6 / 20	7 / 0 / 7 / 0	7.9	13.9
K _{gew.}	10	2.8×10^6 / 16	7 / 0 / 7 / 0	8.1	14.4
B ₁	10	4.0×10^6 / 76	1 / 0 / 7 / 6	45.0	45.0
B _{1 gew.}	10	0.4×10^6 / 78	1 / 0 / 7 / 6	67.0	67.0

Der Versuch demonstriert das Ausmaß der Tumorzellschädigung in Abhängigkeit von der Hydrazon-Einwirkungsdauer. Die Schädigung ist ersichtlich aus der niedriger werdenden Zellzahl im Medium und der steigenden Totzahl, sowie der steigenden Unfähigkeit der Zellen, nach 7 und 10 Stunden in den Mäusen (mittleres Ausgangsgewicht 22.2 g) einen progressiven Tumor zu entwickeln. Nach 7-stündiger Inkubationszeit der

EATZ mit $10^{-3}M$ B₁ und nachfolgender Inokulation bleiben 30.8% der Tiere tumorfrei im Gegensatz zum letzten Versuch, erklärbar durch die regenerationsfähige Kompetenz (Löffler, 1974) der Zellen während des Waschvorganges oder aber durch die durch das Waschen effektiv auf 5:20 h verkürzte Einwirkungszeit. Nach 10-stündiger Inkubationszeit der EATZ bleiben 85.7% der Tiere tumorfrei. Die Immunitätslage der Mäuse verschlechtert sich nicht durch mitgespritztes B₁, dagegen vermindert der Waschvorgang die Zellzahl, die durch Zentrifugieren bei 1000 g z.T. zerstört werden.

III D 3. Immunologisches Verhalten der Tiere

Tabelle 34: Immunitätsentwicklung der tumorfrei gebliebenen Tiere des letzten Versuchs (Tabelle 33) gegen EATZ 43 Tage nach Erstinokulation

Gruppe	eingesetzte Tiere/ Tiere mit flüssigem Tumor/ Tiere mit solidem Tumor/ tumorfreihe Tiere	DAZ in Tagen	DÜZ in Tagen
Kontrolle	10 / 10 / 0 / 0	8.6	20.0
B ₁ , 7 h	1 / 1 / 0 / 0	9.0	21.0
B ₁ gew., 7 h	3 / 3 / 1 / 0	15.0	31.7
B ₁ , 10 h	6 / 5 / 1 / 0	12.7	33.3
B ₁ gew., 10h	6 / 5 / 3 / 0	16.7	42.5

Nach Vorbehandlung mit B₁ - inkubierten EATZ ist bei den Mäusen (Mittelgewicht bei Zweitinokulation 40.1 g) eine Verbesserung der Immunitätslage eingetreten, die sich in einer Überlebenszeitverlängerung äußert (α = 5-10%), jedoch Tumorentwicklung nach Zweitinokulation nicht verhindert (Methode 10).

Auffallend ist das Vorkommen von primär solidem Tumor, der sich an der Einstichstelle entwickelt und dem z.T. die disperse Tumorform folgt. Die Injektionsstelle scheint besonders anfällig und der hier entstehende solide Tumor immunologisch besonders schwer angreifbar zu sein. Die Immunität scheint ebenfalls erhöht zu sein, wenn B_1 vor der Inokulation abgetrennt wird, erklärbar über seine immunsuppressive Eigenschaft, jedoch ermöglicht die Größe des Kollektivs hier keine eindeutige Aussage.

Aufschluß über eine mögliche Immuntherapie, Stärke und Dauer der aktiven Immunisierung sowie Ursache der Immunität gibt ein weiterer Versuch. Nach Methode 10a wurden EATZ mit und ohne B_1 12 h inkubiert. An Hand des Mediumindikators und mit pH-Papier wurde laufend der pH kontrolliert und durch einmaliges Waschen und Mediumaustausch nach 3 und 7 h sichergestellt, daß der pH nicht unter pH 6 sank. Die effektive B_1 - Einwirkungszeit betrug damit etwa 11:15 h. Während der Inkubation wurden wegen der Zellysis laufend Zellkonzentrationen und Totzahl (Trypanblaufärbung) in der Kontroll- und B_1 -Suspension bestimmt. Die Ausgangszellzahl von 36.6×10^6 Zellen/ml bei einer Totzahl von 11% war nach 12-stündiger Inkubation bei der Kontrolle auf 12.9×10^6 Zellen/ml bei einer Totzahl von 18.6% abgesunken, unter B_1 auf 12.3×10^6 Zellen/ml bei einer Totzahl von 57.7%. Nach 12 h wurden die Zellen zweimal durch zentrifugieren für 4 Min. bei 500 g mit Vollmedium gewaschen und jeder Maus 2×10^6 noch lebende, d.h. nicht durch Trypanblau färbbare Zellen in 0.2 bzw. 0.4 ml Medium i.p. inokuliert. Um die Frage zu klären, ob die

partielle Immunentwicklung der Mäuse auf vorgeschädigten, nicht mehr vermehrungsfähigen, aber noch lebenden EATZ, oder aber auf einer Reaktion auf totes Zellmaterial erfolgt - die Überlebenszeit der vorgeschädigten Zellen im Peritoneum der Maus ist nicht zu kontrollieren - wurde nach einer Methode gesucht, mit deren Hilfe man EATZ schnell und zu 100% abtöten kann bei weitgehender Erhaltung der Zell- und speziell der Oberflächenstruktur.

In Frage kommen Röntgenbestrahlung, Ultraschall, chemische Agentien, Erhitzen und wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Zum Erfassen aller Zellen müssen Röntgenstrahlen in einer Leistung eingesetzt werden, die zur Zerstörung der meisten Zellen führt, ebenso wie der schlecht dosierbare Ultraschall. Chemische Agentien benötigen eine zu lange Einwirkungszeit und schädigen direkt und über den Stoffwechsel auch Oberflächenproteine, Erhitzen führt ebenso zur Denaturierung.

Gewählt wurde deshalb die Kältebehandlung analog Methode 10b, die zum Zelltod innerhalb einer guten Stunde führt, wobei ein Drittel der Zellen ihre Form behält und keine morphologische Schädigung aufweist.

Die Versuche haben gezeigt, daß eine genügend lange Inkubation der EATZ mit Hydrazon nicht zum sofortigen Zelltod führt, wohl aber zur Vermehrungsinkompetenz führenden Zellschädigung.

Mit wechselweisem Einfrieren und Auftauen der Zellen kann man innerhalb kurzer Zeit alle Zellen abtöten, wobei die

Tabelle 35: Zeitabhängige Immunitätsentwicklung von Mäusen
nach Applikation B₁ - inkubierter und kältebehandel-
ter EATZ

Gruppe	Inokulation aktiver EATZ		Mittelge- wicht d. Mäuse bei		eingesetzte Tiere/Tiere mit fl.Tu- mor/Tiere mit sol. Tumor/tu- morfreihe Tiere	DAZ in Ta- gen	DÜZ in Ta- gen	$\alpha(\%)$
	Tag	Totz.%	Erst- inoku- lation	Zweit- inoku- lation				
A:12 h inkubiert	-		26.5	-	10/10/2/0	13.2	26.8	
B:12 h mit B ₁ inkubiert	-		28.5	-	10/ 0/0/10	-	-	
C:Kontrolle für D	-1	0	27.0	-	7/ 7/0/0	9.0	19.9	50
D:12 h mit B ₁ inkubiert	-1	0	27.4	29.8	10/10/1/0	10.0	24.7	
E:Kontrolle für F	+14	28.9	-	35.7	7/ 7/0/0	8.1	16.9	0.2-1
F:12 h mit B ₁ inkubiert	+14	28.9	27.8	36.2	10/ 7/9 ⁺ /2	10.3	34.1	
G:Kontrolle für H	+36	3.1	-	40.3	7/ 7/1/0	8.0	16.0	1-2
H:12 h mit B ₁ inkubiert	+36	3.1	27.8	37.5	8/ 3/5/1	15.0	45.6	
I:kältebe- handelte EATZ	-		44.0	-	7/ 0/0/7	-	-	
K:Kontrolle für L	+14	2.7	-	43.0	7/ 7/2/0	13.1	26.0	10- 20
L:kältebe- handelte EATZ	+14	2.7	41.5	42.8	10/ 5/4/2	10.9	44.4	

⁺ Bei einem Tier mit solidem Tumor erfolgte eine Rückbildung
nach 15 Tagen.

Zellstruktur (Zellmorphie) bei einem Drittel der Zellen er-
halten bleibt.

Mit diesen vorinkubierten EATZ inokulierte Mäuse zeigen ein charakteristisches von der Kontrolle abweichendes Verhalten, das zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führt und durch eine Immunaktivierung erklärt werden kann.

Mit EATZ i.p. inokulierte Kontrolltiere entwickeln ausnahmslos dispersen Tumor, der durchschnittlich innerhalb 19.7 Tagen zum Tode führt. Lediglich bei Kontrollgruppe K traten bei zwei Tieren linsengroße Tumoren an der Einstichstelle auf, jedoch gleichzeitig mit dem dispersen Tumor und ohne Einfluß auf die DÜZ.

Mit B₁ - inkubierten - EATZ vorbehandelte Mäuse besitzen zu etwa 45% die Fähigkeit zur Unterdrückung des dispersen Tumors, jedoch bilden sich in der Folge an der Einstichstelle, der immunologisch wahrscheinlich unterversorgten Bauchdecke, und nur hier solide Tumoren aus, die z.T. durch Zellabspaltung zu einem späteren Zeitpunkt noch zu einem dispersen Tumor führen. Die Immunkompetenz drückt sich aus in einer Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit von Mäusen mit Tumorentwicklung gegenüber Kontrolltieren auf Grund eines nur langsam progredienten soliden Tumors oder einer späten Entwicklung der dispersen Tumorform, sowie im Vorkommen von tumorfreien Tieren mit ausreichender Resistenz gegen EATZ. Auch die Zeit bis zur sichtbaren Tumorausbildung (DAZ) ist verlängert.

Eine Tumorentwicklung an der Injektionsstelle sollte bei Gruppe H umgangen werden, indem den Mäusen 11 Tage vor der Zweitinokulation nach Perforation der Bauchdecke lateral ein Vinylkatheter gelegt wurde, durch den die zweite Applikation

von EATZ erfolgte. Eine Kontrolle der Katheter 4 Tage nach Zweitinokulation ergab jedoch, daß diese nicht festgewachsen waren, sondern locker im nicht verheilten Perforationskanal lagen und sich eben an dieser Stelle wieder solide Tumoren bildeten.

Bei den Gruppen D und L, also der mit B_1 inkubierten EATZ therapierten und der mit kältebehandelten EATZ vorbehandelten Gruppe scheint unter Berücksichtigung nur der Tiere mit disperser Tumorentwicklung eine immunologische Beeinflussung im Sinne des Enhancement-Phänomens vorzuliegen, da eine DÜZ - Verkürzung um 5.5% (Gruppe D) bzw. um 19.2% (Gruppe L) gegenüber den Kontrollen vorliegt.

Die Berücksichtigung aller Tiere ergibt, daß eine Tumorthera-
pie mit B_1 -inkubierten EATZ nicht möglich ist, die DÜZ-
Verlängerung resultiert aus nur einem Tier mit solidem Tumor.
Dagegen kann man nach Impfung mit B_1 -vorbehandelten EATZ und
Zweitinokulation mit aktiven EATZ nach 14 und 36 Tagen von
einer starken Verbesserung der Immunkompetenz sprechen.

Die Ursache hierfür muß auf einer Reaktion der Maus auf
Oberflächenstrukturen der Ascites-Zelle beruhen und setzt
nicht notwendigerweise die Lebensfähigkeit der Ascites-Zelle
voraus, wie sich aus dem Kontrollversuch L ergibt. Dieser
weist zwar keine signifikante Überlebenszeitverlängerung aber
ebenfalls 2 Tiere mit Tumorresistenz auf.

Mit dieser Methode der Impfung mit vorgeschädigten Tumor-
zellen ist so eine weitere Möglichkeit der Prophylaxe gegeben,
welche gegenüber dem risikoreichen Verfahren der lebend-Tumor-
Implantation und folgender chirurgischer Wiederentfernung

(Thunold, 1967) Vorteile bietet und vom Verfahren her mit der Applikation von EAT - Cytoplasten (Wacker et al., 1976) vergleichbar ist.

III E Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zum Nukleotidstoffwechsel von EATZ unter A₁ und F₁

III E 1. Prämisse

Braun et al., (1976a) fanden bei der Untersuchung der Wirkung von A₁ und B₁ auf die Syntheseleistung der Ascites-Zellen eine verminderte DNS-, RNS- und Proteinsynthese. Sie fanden einen Anstieg der Aktivität im säurelöslichen Nukleotidpool unter A₁ und eine Verminderung bei gleichzeitiger Phosphorylierungshemmung von Thymidin und Uridin zum Triphosphat unter B₁. Die von Hefter (1977) gefundene starke Glykolysesteigerung unter B₁ deutet auf einen erhöhten Energiebedarf hin. Der daher gesteigerte ATP-Verbrauch limitiert möglicherweise die Nukleotidphosphorylierung. Weitzel et al. (1967) fanden, daß Hydrazin und Methylhydrazin die de novo Synthese von Desoxyribonukleosiden hemmen, wobei A₁ die Synthese von DNS, RNS und Protein stärker hemmt als das zum Vergleich herangezogene Methylhydrazin und Dimethylhydrazin (Braun et al., 1976a).

Ein Angriff der Hydrazinderivate A₁ und B₁ in der Nukleinsäuresynthesekette vor dem polymerisierenden Schritt sollte mit einem geeigneten chromatographischen Verfahren durch Auftrennung der Nukleinsäurebausteine der Zelle wie Basen,

Nukleoside, Nukleotide, Vorstufen wie IMP und Abbauprodukte wie Hypoxanthin geklärt werden.

Eine mögliche alkylierende Wirkung der Hydrazinderivate sollte ebenfalls chromatographisch nachgewiesen werden, wenn das bevorzugt alkylierte Guanosin und das 7- Methylguanosin unterschiedliche Laufeigenschaften besitzen.

Weiterhin sollte durch Kältevorinkubation der EATZ mit markierten Vorstufen eine Stoffwechselveränderung durch die Testsubstanzen unabhängig von Membraneffekten nachgewiesen werden. Dieser Versuch wird durch eine Bestimmung der Polymeraseaktivität ergänzt.

Zur Auftrennung und quantitativen Bestimmung von EAT-Zell-extrakten wurde die Dünnschichtchromatographie (DC, TLC) gewählt, da sie mit geringen Mengen Zellextrakt auskommt, ein gegenüber der Säulenchromatographie relativ zeitsparendes Verfahren ist und durch Einsatz radioaktiv markierter Nukleinsäurebestandteile quantitativ reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die DC stellt eine Kombination von Papier- und Säulenchromatographie dar mit den Vorteilen einer geringen Laufzeit und der Verwendbarkeit verschiedenartigster Gerüstsubstanzen, die mit Hilfe eines geeigneten Bindemittels als dünne Schicht auf Aluminium-, Glas- oder Kunststoffplatten aufgebracht werden. Die Nachteile bestehen in einer geringen Kapazität der DC-Platte und der schwierigen Identifikation unbekannter, nicht radioaktiv markierter Flecken. Die chemischen und physikalischen Mechanismen der Trennungseigenschaft einer Matrix werden von Helfferich, 1965 beschrieben.

Zur DC-Auftrennung der Zellextrakte boten sich eine Reihe voneinander abweichender Methoden an. Grundlegende Arbeiten von Randerath zeigen eine steigende Verwendung von Polyäthylenimin (PEI) Zellulose. Nach Verwendung von Ecteola- (1961) und DEAE-Zellulose (1962) setzte Randerath (1962, 1963) PEI-Zellulose als basische polymere Gerüstsubstanz mit Anionenaustauscherqualität ein, indem er Whatman Nr.1 Chromatographiepapier in eine PEI-Zelluloselösung tauchte und mit Hilfe der enthaltenen Elektrolyte und Aq.dest als Fließmittel Nuklotide trennte.

1965 untersuchten Neuhard und Munch-Petersen den säurelöslichen Nuklotidpool von E.coli durch Ausäthern des TCA-Extraktes und zweidimensionale Entwicklung auf PEI-Zellulose-Platten. 1. Fließmittel: 2 M LiCl - 2 M Hac (1:1, v/v), 2. Fließmittel: 3.0 M NH_4ac , 5% H_3BO_3 , pH 7 mit NH_3 .

1967 beschreibt Pataki die Trennung von Nukleobasen, Nukleosiden und Nukleotiden durch zweidimensionale DC auf MN-300-Zellulose. Er verwendet als erstes Fließmittel n-Propanol, 25% NH_3 -Lösung, Wasser (6:3:1, v/v), als zweites Fließmittel Isopropanol, gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, Wasser (2:79:19, v/v) und benutzt zur Identifikation UV-Licht mit 254 und 360 nm.

Noch 1967 verwandte er zusammen mit Niederwieser als verbesserte Methode mit PEI behandelte MN 300 Zellulose, die Schicht wird mit 10% NaCl / Aq. und Aq. vorbehandelt, das Fließmittel ist ein LiCl Gradient mit aufsteigender Konzentration (0.1 M - 2M).

1972 verwandte Reyes PEI-Zellulose und Aq.dest als Fließmittel zur Aktivitätsbestimmung der "Rettungsenzyme", wobei er Basen und Nukleoside abtrennte und die Nukleotide stationär bleiben. Eine Auftrennung von Nukleinsäurebausteinen nach Isolierung aus Leber wurde 1972 von Lust und Sahud durchgeführt. Gefrorene Leber wird in 7.0 ml kalter 12%iger (G/v) TCA homogenisiert und nach Zentrifugieren die TCA aus dem Überstand mit 5x20 ml Diäthyläther entfernt. Nach Reinigung und Konzentrierung wird der Zellextrakt auf vorbehandelte PEI-Zelluloseplatten aufgetragen und zweidimensional entwickelt.

Die 1. Entwicklung erfolgt stufenweise mit Ammoniumformiat in steigender Konzentration bei pH 6,5-7. Nach Fließmittelentfernung im Methanolbad folgt die 2. Entwicklung senkrecht zur ersten mit steigender Ammoniumformiatkonzentration bei pH 3,5.

Jones et al. (1972) bestimmten den Gehalt an Adenosinphosphaten im Kaninchenherz. Sie homogenisierten gefrorenes Herzmuskelgewebe in 0.6 N PCA, neutralisierten den Überstand mit KOH und entfernten den KClO_4 -Niederschlag. Die erste Entwicklung auf PEI-Zellulose-Platten erfolgte mit Aq., wobei die basischen oder neutralen Verbindungen (Nukleobasen u. Nukleoside) auf Grund von Verteilungsprinzipien wandern, die zweite gleichsinnige Entwicklung erfolgte mit 1.25 M NaCl, wobei die Nukleotide auf Grund des Anionen-Austausch-Prinzips aufsteigen.

Pflüger verwandte 1975 mit 1.0 M NaCl präparierte PEI-Zellulose in einer Säule zur Analyse von sauren Hefezelleextrakten

und konnte durch Auffangen von kleinen Fraktionen 19 Bestandteile qualitativ und quantitativ bestimmen. Für diesen haltbaren Anionenaustauscher auf Zellulosegrundlage verwandte er einen konkaven NaCl Gradienten und benötigte bis zum GTP-peak 15.5 h.

Aus einer Vielzahl der o.a. Methoden sollte eine geeignete, nämlich zeitsparende und reproduzierbare Kombination übernommen werden.

III E 2. Ausarbeitung eines geeigneten Trennverfahrens

Erste Trennversuche von Nukleotiden wurden in Anlehnung an das o.a. Verfahren von Jones, Parker und Smith durchgeführt, die als Fließmittel I Aq. dest und nach Trocknen der Platte als Fließmittel II eine 1.25 M NaCl-Lösung für ein eindimensionales Chromatogramm einsetzten. Dieses Verfahren gestattet bei alleiniger Verwendung des Fließmittels I eine Retention der Nukleotide und das gleichzeitige Entwickeln von bis zu 14 Proben, vermindert den apparativen Aufwand für einen Gradienten und liefert gute Trennungen bei guter Reproduzierbarkeit. NaCl ließe sich durch LiCl ersetzen, was bei gleichem Trennverhalten den Vorteil besitzt, aus dem Eluat mit Äther-Äthanol-Gemischen ausschüttelbar zu sein, jedoch hat sich zusammen mit der Zellulose isoliertes NaCl nie störend bemerkbar gemacht. Bei Einsatz eines Zellextraktes läßt sich aus der Vielzahl der Nukleotidbausteine die Synthesegruppe einer Base bestimmen, indem man die Zellen mit einem markierten Nukleosid inkubiert und an Hand von Vergleichssubstanzen oder des bekannten RF-Wertes das Nukleosid und die entsprechen-

den Phosphate wieder isoliert und radiochemisch bestimmt.

III E 2 a. Trennungen mit verschiedenen Fließmitteln

Für erste Trennungen wurden Adeninderivate in Mengen von 5 und 10 µg (1mg/ml) aufgetragen, nämlich AD, ADO, d-ADO, AMP, d-AMP, ADP, ATP, d-ATP, c-AMP, eine Mischung dieser Substanzen und z.T. Orotsäure, OMP, Inosin, ITP und Hypoxanthin, wobei das Fließmittel variiert wurde:

- a) 1) Aq., 2) 1.25 M, NaCl
- b) 1) Aq., 2) 1.25 M NaCl, 3) Aq.
- c) 1) Aq., 2) 1.25 M NaCl, 3) 1.25 M NaCl
- d) 1) Aq., 2) Aq., 3) 2 M NaCl
- e) 1) Aq., 2) 3 M NaCl
- f) 1) Aq., 2) 1.5 M NaCl
- g) 1) Aq., 2) 1.75 M NaCl

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Ribose- und Desoxyribosederivate haben gleiche RF-Werte und sind nicht voneinander zu trennen.

Mit einer Substanzmischung von 45 µg Reinsubstanz ist die Plattenkapazität noch nicht überschritten, es treten keine Flecken mit Schwänzen auf. Folgt einer NaCl-Entwicklung eine nochmalige Chromatographie mit Wasser, so zieht sich der ATP-Fleck auf Grund der NaCl-Verdünnung auseinander. Mit drei Entwicklungen wie Aq./Aq./NaCl kann man Basen und Nukleoside zu höheren RF Werten verschieben und damit weiter von den Phosphaten abtrennen, jedoch sind dann Basen und Nukleoside von Pyrimidinen durch Anstau im oberen Bereich noch schlechter

zu trennen.

Die Molarität der Salzlösung ist ohne Einfluß auf den RF-Wert von Basen und Nukleosiden, jedoch steigt der RF-Wert der Nukleotide mit steigender Salzkonzentration:

NaCl Konzentration	1.25 M	1.5 M	1.75 M	2.0 M	3.0 M
R _F ATP	0.04	0.10	0.16	0.27	0.65

Für die folgenden Chromatogramme wurde die Kombination

1) Aq., 2) 1.5 M NaCl gewählt, da sich hier im Gegensatz zur 1.25 M NaCl die Triphosphate eindeutig von der Startlinie lösen und von stationären Bestandteilen trennen.

III E 2 b. Löslichkeit der Vergleichssubstanzen

Alle Vergleichssubstanzen wurden in Wasser gelöst. Dabei sollte wegen der relativ schweren Löslichkeit von einigen Basen und Nukleosiden eine Menge von 5 µg / Fleck und Substanz nicht überschritten werden, die Menge, in der Guanosin beginnt auf der Platte einen kleinen Schwanz zu bilden. Eine einfache aber auch ungenaue Methode besteht darin, eine kalte gesättigte Lösung aufzutragen, die weniger Substanz enthält, als eine erhitzte Lösung, deren Fleck aber noch gut indentifizierbar ist.

Als einzige Vergleichssubstanz schied Guanosin aus, das nur im alkalischen löslich ist.

III E 2 c. Demonstration des Trennverhaltens

Zur Veranschaulichung wurde eine Trennung mit allen Reinsubstanzen und einem EAT-Zellextrakt durchgeführt. Mit der Platte wurde zum Waschen 3x Aqua dest. bis zur Oberkante hochgezogen, die weitere Präparation erfolgte nach Methode 16. Die Nukleotidmischungen wurden in Flecken von 0.2x0.6 cm und Konzentrationen von 5 µg/Substanz, der EAT-Zellextrakt in 10 µl entsprechend 5×10^6 Zellen in einem Abstand von 1.4 cm aufgetragen (Methode 17). Die Herstellung des EAT-Zellextrakts erfolgte nach Methode 12, die Entwicklung der Platte nach Methode 18. Die Flecken haben durchschnittlich 0.9 cm Durchmesser.

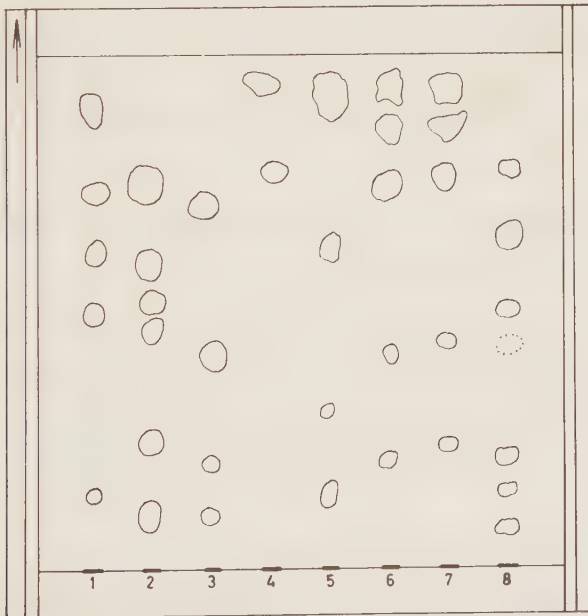


Abb. 6: DC-Trennung von Nukleotid-Reinsubstanzen (1-7) und einem EAT-Zellextrakt (8).

Tabelle 36: Zusammenfassung der R_f - Werte der Flecken von oben nach unten und von links nach rechts.
1-7: Reinsubstanzen, 8: EAT-Zellextrakt

1	2	3	4
Inosin : 0.90	ADO : 0.75	GUO: 0.71	7-Methyl-
Hypoxanthin : 0.74	AD : 0.59	GMP: 0.41	GUO: 0.95
IMP : 0.62	c-AMP : 0.52	GDP: 0.21	7-Methyl-
OMP : 0.50	AMP : 0.47	GTP: 0.1	GMP: 0.77
ITP : 0.15	ADP : 0.25		
	ATP : 0.11		

5	6	7	8
Cyt : 0.92	Thyd: 0.94	UD : 0.94	a : 0.77
Cyto: 0.85	Thy : 0.85	URA : 0.85	b : 0.65
CMP : 0.63	TMP : 0.75	UMP : 0.76	c : 0.50
CDP : 0.31	TDP : 0.41	UDP : 0.45	d : 0.43
CTP : 0.14	TTP : 0.21	UTP : 0.24	e : 0.22
			f : 0.15
			g : 0.08

III E 2 d. Methoden zur Isolierung markierter Substanzen von der DC-Platte

Eine optimale Wiedergewinnung der Aktivität von der DC-Platte wurde durch Anwendung verschiedener Isolierungsmethoden gefunden. Dabei wurden 0.1, 0.5 und 1.0 μCi ^3H Thymidin zusammen mit 5 μg unmarkiertem Thymidin zur Sichtbarmachung auf der Platte

- 1) mit Dioxan-Szintillatorflüssigkeit direkt gezählt,
- 2) nach Entwicklung mit 1.5 M NaCl von der Platte abgekratzt und in Dioxan-Szintillatorflüssigkeit nach kurzem Schütteln

gezählt,

- 3) nach Entwicklung mit 1.5 M NaCl durch Ausschneiden des entsprechenden Plattenabschnitts und Aufbringen auf den Boden des Szintillatorgläschens in Dioxan-Szintillatorflüssigkeit gezählt.

	cpm bei direktem Zählen	cpm nach Auskratzen	cpm auf Plattenab- schnitt
0.1 µCi	7200 = 100%	4840 = 67.2%	4030 = 56.0%
0.5 µCi	38410 = 100%	25310 = 65.9%	19510 = 50.8%
1.0 µCi	68840 = 100%	45690 = 66.4%	35850 = 52.1%

Zur Auflösung der Matrix wurde in einem weiteren Versuch NCS zugesetzt. Dabei wurden 3.0 µg ³H-Uridin mit Dioxan-Szintillatorflüssigkeit

- 1) direkt gezählt
- 2) nach Auftragen auf Platte und ohne Entwicklung nach Auskratzen gezählt
- 3) nach Auftragen auf Platte, Auskratzen ohne Entwicklung der Platte, Versetzen mit 0.5 ml NCS, 1 h schütteln und 12 h stehenlassen die Dioxan-Szintillatorflüssigkeit zugesetzt, 1/2 h geschüttelt, weitere 12 h kalt und dunkel stehen gelassen und gezählt.

	nach 1)	nach 2)	nach 3)
cpm	48735.0	7695.0	6612.5
%	100	15.8	13.6

Die Methode der Wahl besteht im Auskratzen der aktivitätshaltigen Zelluloseflecken, wobei NCS keine Verbesserung bringt. Ein Herauslösen der Aktivität durch 6-stündiges Rühren mit

0.5 ml 0.01 M HCl und Neutralisieren des Überstandes mit 0.5 ml 0.01 M NaOH brachte ebenfalls keine Verbesserung.

III E 2e. Herstellung eines Nukleotidextraktes aus EATZ

Bei der Herstellung eines Nukleotidextraktes aus EATZ stellen sich mehrere Fragen:

- a) mit welchem Extraktionsmittel werden die Zellen behandelt,
 - b) wie wird eine Nukleotidspaltung durch die Säure verhindert,
 - c) wie erreicht man wieder einen annähernd neutralen pH,
 - d) mit welchem Flüssigkeitsvolumen muß das Lyophilisat aufgenommen werden,
 - e) und wo liegt die Grenzkapazität der Platte für EATZ-Extrakte.
- a) Zur Herstellung saurer Zellextrakte werden Perchlorsäure (PCA) und Trichloressigsäure (TCA) in 5 bis 10%iger Konzentration bei gleicher Wirksamkeit beschrieben.
- b) Triphosphate werden nach unterschiedlicher Aufarbeitung auf der Platte entwickelt.
- 1) 1 mg ATP/1ml TCA 5%, 20 min. rühren, 5 µl = 5 µg auftragen
 - 2) 1 mg ATP/1ml PCA 5%, 20 min. rühren, 5 µl = 5 µg auftragen
 - 3) 1 mg ATP u. 1 mg d-TTP/4ml TCA 5%, 20 min. rühren,
Extraktion mit 2x5 ml Äther, Rückstand / 1 ml Aq.,
5 µl = 5 µg auftragen
 - 4) 1 mg ATP/4ml TCA 5%, 20 min. rühren, lyophilisieren,
Extraktion mit 5x5 ml Äther, Rückstand/1 ml Aq., 5 µl
= 5 µg auftragen
 - 5) 1 mg ATP/4ml TCA 5%, 20 min. rühren, Extraktion mit
5x5 ml Äther. lyophilisieren, Rückstand/1 ml Aq., 5 µl
= 5 µg auftragen

- 6) wie 5), Lyophilisat nochmals mit 5x5 ml Äther extrahieren, Rückstand / 1 ml Aq., 5 μ l = 5 μ g auftragen
- 7) 1 mg ATP/4ml TCA 10%, 20 min. rühren, Extraktion mit 8x5 ml Äther, lyophilisieren, Rückstand / 1 ml Aq., 5 μ g = 5 μ g auftragen
- 8) wie 7), Lyophilisat mit 4x10 ml Äther extrahieren, Rückstand / 1 ml Aq., 5 μ l = 5 μ g auftragen
- 9) 1 mg ATP u. 1 mg d-TTP/4ml Aq., 20 min. rühren, lyophilisieren, Extraktion mit 2x5 ml Äther, Rückstand / 1 ml Aq., 5 μ l = 5 μ g auftragen

Bei 1) und 2) verschmieren die Triphosphate von der Grundlinie bis zu einem R_F von 0.14, Spaltprodukte sind zwischen R_F 0.57 und 0.75 sichtbar. Nach 3) sind deutlich sichtbar neben den Triphosphaten auch die Mono- und Diphosphate. Nach 4) ist neben ATP das Diphosphat und schwächer das Monophosphat sichtbar. Bei 5) und 6) findet keine optisch sichtbare Zersetzung des ATP statt, desgleichen bei 7), 8) und 9). In der Folge wurde vor dem Lyophilisieren von 4 ml eines 10%igen TCA- Extrakts mit 8x5 ml und nach dem Lyophilisieren mit 4x10 ml Äther ausgeschüttelt.

- c) Die pH-Erhöhung eines sauren Zellextraktes kann durch Ausfällen der PCA als Kaliumperchlorat oder durch Extrahieren der TCA mit Äther erfolgen.

Die Neutralisation der PCA erfolgte mit 0.1 M KOH gegen Methylrot und mit 1 N KOH bei anschließender Rücktitration mit 0.01 %iger PCA am pH-Meter. Methylrot ist zur Neutralisation geeignet, stört jedoch durch die rote Eigenfarbe bei einem R_F = 0.16 auf der Platte. Mit der Rücktitration

am pH-Meter lassen sich ohne Schwierigkeiten pH-Werte von 6.5-7.3 einstellen, die die R_F -Werte nicht beeinflussen. Die Rücktitration wurde gewählt, um das Volumen nicht unnötig zu vergrößern. Das Kaliumperchlorat kristallisierte während ca. 16 h in der Kälte aus. Der Überstand wurde lyophilisiert und in 0.1 bis 1.0 ml Aq. aufgenommen. Untersucht wurden EAT-Zellextrakte, denen UTP als Marker zugesetzt wurde. Bei guten Trennungen bis zu 10 Nukleotiden bestand die Schwierigkeit in dem noch im Lyophilisat enthaltenen $KClO_4$, das auf Grund seiner Salzeigenschaft die R_F -Werte der Nukleotide in Abhängigkeit vom aufgetragenen Volumen erhöhte. So entsprach der R_F (UTP), das einem Zellextrakt als Marker zugesetzt wurde bei 1.0 μ l des Lyophilisats noch der Vergleichsprobe, 2, 10, 20 und 50 μ l besaßen um die Faktoren 1.08 / 1.39 / 1.77 / 2.23 erhöhte R_F -Werte. Der Salzgehalt ist auch daran sichtbar, daß bei höheren Volumina $KClO_4$ am Startfleck auf der Platte auskristallisierte.

Durch Ätherextraktion läßt sich dagegen der pH von TCA-Extrakten soweit erhöhen, daß R_F -Werte von Nukleotidreinsubstanzen und Zellnukleotiden der Kontrolle entsprechen.

- d) Bei der sauren Extraktion der EATZ wurden bis zu 200 Mio. EATZ in 4.0 ml TCA oder PCA aufgenommen, eine zur Lösung ausreichende Menge, jedoch muß bedacht werden, daß nach Zentrifugieren und Abtrennen des Überstandes noch am Sediment haftende Flüssigkeit noch Nukleotide in hoher Konzentration enthält, die durch eine zweite saure Extraktion quantitativ isoliert werden können. So ergaben Extrakte von

50 und 200 Mio. EATZ in 4 ml TCA 10% nach Aufarbeitung und Auftrennung des Extraktes von 1 Mio. EATZ jeweils 5 Flecke gleicher Farbintensität.

Gesammelte Ätherextraktionen enthalten nachweislich keine Nukleotide, zweifaches Lyophilisieren bringt keine Vor- und Nachteile.

Das Lyophilisat wird in kaltem Aq. dest. aufgenommen, wobei ein Trockenextrakt aus 200 Mio. Zellen sich noch in 0.2 ml, nicht mehr in 0.1 ml Aq. vollständig löst. Ein Extrakt aus 100 Mio. EATZ ergibt nach Aufnehmen in 0.1, 0.2 und 0.5 ml Aq. und Auftrennen von Extrakten aus jeweils 5 Mio. Zellen Flecken gleicher Anzahl und Farbintensität. Um an der Zentrifugenglaswand anhaftendes Lyophilisat abspülen zu können, sollte das Flüssigkeitsvolumen nicht unter 0.2 ml liegen.

- e) Die Kapazität und das Auflösungsvermögen der DC-Platte für EAT-Trockenzellextrakte wurde mit steigenden Zellkonzentrationen untersucht. Dabei wurden bei 0.2 Mio. EATZ 2 Flecke, 0.5 Mio. 3 Flecke, 1.0 Mio. 5-6 Flecke, 5.0 Mio. 6-7 Flecke, 10.0 Mio. und 20.0 Mio. 9-10 Flecke auf der Platte sichtbar. Die Kapazität der Platte liegt bei knapp 10 Mio. Zellen, da ab 10 Mio. EATZ die Triphosphate mit niedrigem R_F zu verschmieren beginnen. Im folgenden wurden daher maximal 10 Mio. EATZ als Trockenextrakt pro Fleck auf die Platte aufgetragen.

III E 3. Markierungen mit ^3H -Uridin

Zur Bestimmung der Nukleosidphosphorylierungshemmung durch B_1 wurden EATZ mit ^3H -Uridin inkubiert und nach DC-Trennung die Phosphatanteile bestimmt.

Die Gewinnung der EATZ erfolgte nach Methode 11, die Herstellung des Zellextraktes nach Methode 12, die Präparation der DC-Platte nach Methode 16, 17 und 18, die Aktivitätsbestimmung des säurelöslichen Zellextraktes nach Methode 13a und des säureunlöslichen Rückstandes nach Methode 14.

III E 3 a. Optimierung der Aktivitätsausbeute

Gegenüber einem Vorversuch, von dem zu wenig Aktivität auf der DC-Platte erhalten wurde, wurde die Zahl der EATZ von 100×10^6 auf 200×10^6 EATZ erhöht, eine Aktivität von 2.0 und 10.0 $\mu\text{Ci}/20 \text{ ml}$ Ansatz eingesetzt, die Inkubationsdauer von 15 auf 30 min. verlängert und eine Menge Lyophilisat entsprechend 2.5 und 5×10^6 EATZ auf die Platte aufgetragen.

Gruppe I : 200×10^6 EATZ/2.0 $\mu\text{Ci}/20 \text{ ml}$ Vollmedium, Inkubationsdauer 15 min.

Gruppe II : 200×10^6 EATZ/10.0 $\mu\text{Ci}/20 \text{ ml}$ Vollmedium, Inkubationsdauer 15 min.

Gruppe III: 200×10^6 EATZ/2.0 $\mu\text{Ci}/20 \text{ ml}$ Vollmedium, Inkubationsdauer 30 min.

a : 0.5 ml des TCA-Extrakts werden direkt gezählt

b_1 : 25 μl des Lyophilisats = 5 Mio. EATZ werden direkt gezählt

b_2 : 12.5 μl des Lyophilisats = 2.5 Mio. EATZ werden direkt gezählt

c_1 : 25 μ l des Lyophilisats werden auf PEIZ-Platte aufgetragen, ohne Entwicklung ausgekratzt und gezählt

c_2 : 12.5 μ l wie c_1

d_1 : 25 μ l werden nach c behandelt, die PEIZ 4 h mit 0.5 ml 0.01 M HCl geschüttelt, der Überstand mit 0.5 ml 0.01 M NaOH neutralisiert und gezählt

d_2 : 12.5 μ l wie d_1

Als Vergleich dienten 2.0 μ Ci ^3H -UD direkt gezählt mit 324897.5 counts, bzw. 10 μ Ci mit der entsprechenden Countzahl, eine Lösung aus 0.5 ml 0.01 M HCl und 0.5 M NaOH enthält keine Aktivität

Tabelle 37: cpm in Abhängigkeit von der Aufarbeitung, für die Prozentangaben ist die gezählte Aktivität auf das Gesamtvolumen bezogen und in % der direkt gezählten 2.0 bzw. 10.0 μ Ci ^3H -UD ausgedrückt, wobei beide Zellkonzentrationen zusammengefaßt sind.

	I, cpm	II, cpm	III, cpm	I, %	II, %	III, %
a	2155.25	10785.75	1778.25	5.3	5.3	4.4
b_1	939.5	4815.75	764.00	12.21	12.52	9.63
b_2	521.75	2677.75	400.25			
c_1	98.75	560.00	69.00	1.15	1.31	0.81
c_2	44.0	251.50	31.00			
d_1	80.25	457.75	71.25	0.87	1.11	0.76
d_2	30.25	220.50	26.00			

Es ist ersichtlich, daß die in die Zelle aufgenommene Aktivität direkt proportional der Außenkonzentration ist, wogegen eine längere Inkubation eher eine Verschlechterung bringt, möglicherweise durch einen Zellzerfall während der Inkubation.

11.5 % der Aktivität werden aufgenommen (b), die TCA reduziert die cpm auf die Hälfte (a) und durch die Absorption der Zellulose wird die Ausbeute auf 1.1% gesenkt (c). Eine Extraktion der Nukleotide aus der Zellulose bringt keine Vorteile, da die kleinen Volumina schlecht quantitativ abtrennbar sind.

III E b Beeinflussung der Aufnahme von ^3H -Uridin in EATZ und des Einbaus in die RNS durch B_1

- (1) In diesem Versuch wird in Zeitabhängigkeit die Stoffwechselbeeinflussung der Asciteszelle durch B_1 mit einer ^3H -Uridin Markierung bestimmt.

Dabei wurden die Zellen 1 h ohne B_1 vorinkubiert und nach ^3H -Uridin-Zusatz die Inkubation nach 5, 20 und 60 min. abgebrochen (I,II,III) bzw. 1 h mit 10^{-3}M B_1 vorinkubiert und die Markierung nach den gleichen Zeiten abgebrochen (IV,V,VI). Zur Bestimmung des Aktivitätsverlusts wurden jeweils in Dioxan-Szintillatorflüssigkeit

- a) 2.0 μCi ^3H -UD direkt gezählt: 370484.6 cpm = 100%
- b) 2.0 μCi ^3H -UD lyophilisiert und eine wässrige Lösung direkt gezählt: 125750 cpm = 33.9%
- c) 2.0 μCi ^3H -UD lyophilisiert, eine wässrige Lösung auf PEIZ aufgetragen, abgekratzt und gezählt: 33430 cpm = 9.0%
- d₁) 2.0 μCi ^3H -UD auf eine PEIZ-Platte der Größe 1.3x1.5 cm aufgetragen, abgekratzt und gezählt: 57962 cpm = 15.7%
- d₂) 2.0 μCi ^3H -UD auf eine PEIZ-Platte der Größe 1.3x3.0 cm aufgetragen, abgekratzt und gezählt: 59520 cpm = 16.1%

e) 2.0 μCi ^3H -UD aufgearbeitet wie der Rückstand:

51184 cpm = 13.8%

Von jeder Zeitabnahme wurde eine wässrige Lösung des Lyophilisats entsprechend 2.5 und 5 Mio. Zellen direkt gezählt und auf 5 Mio. EATZ bezogen (A), die entsprechenden Mengen auf PEIZ aufgetragen und ohne Entwicklung gezählt (B), sowie eine Auftrennung in Uridin und die 3 Phosphate vorgenommen (C).

Der Einbau in den hochmolekularen Bereich wurde nach Methode 14 a untersucht und auf 5×10^6 Zellen bezogen (D). Werden die Aktivitätsverluste bei der Aufarbeitung berücksichtigt, kann man die in die Zelle aufgenommene Gesamtaktivität (E) ermitteln, indem man die säurelösliche (A) und -unlösliche Aktivität (D) addiert.

GN: Zusammenfassung der differenzierten Nukleotide

Die Auswertung ergibt, daß das Maximum an Aktivität schon nach etwa 5 min. in die Zelle aufgenommen ist, unter B_1 nach 20 min. Der Abfall bei einer Stunde geht zu Lasten der löslichen Nukleotide, während der Aktivitätseinbau in den hochmolekularen Anteil der Kontrolle bis zu einer Stunde ansteigt. Unter Hydrazon fällt ein sehr schneller Einbau in den hochmolekularen Bereich auf und ein noch nicht zu deutenden Abfall nach einer Stunde. Die prozentualen Anteile UTP: UD der Kontrolle verschieben sich von 68.7 : 10.0 über 53.3 : 15.7 zu 42.3 : 27.3, unter Hydrazoneinwirkung von 56.1 : 18.6 über 39.5 : 29.2 zu 18.6 : 57.6. Unter dem Hydrazon kommt es zu einem massiven Anstau an Uridin in der Zelle, während keine Phosphory-

Tabelle 38: Beeinflussung des Uridin-Stoffwechsels durch B₁

	I cpm / %	II cpm / %	III cpm / %	IV cpm / %	V cpm / %	VI cpm / %
A	13135.5	11166.5	7546.8	10459.5	11096.5	10118.0
B	1939.0	1810.8	1294.8	1748.3	1760.8	1627.8
C	UTP 872.0 / 68.7	572.75 / 53.3	242.25 / 42.3	588.75 / 56.1	371.75 / 39.5	127.5 / 18.6
	UDP 248.0 / 19.5	309.5 / 28.8	155.5 / 27.2	239.0 / 22.8	264.25 / 28.1	151.75 / 22.1
	UMP 23.0 / 1.8	24.5 / 2.3	18.25 / 3.2	27.0 / 2.6	30.0 / 3.2	11.75 / 1.7
	UD 126.25 / 10.0	168.75 / 15.7	156.25 / 27.3	195.0 / 18.6	275.25 / 29.2	395.25 / 57.6
GN	1269.25 / 100	1075.5 / 100	572.25 / 100	1049.75 / 100	941.25 / 100	686.25 / 100
D	51.7	576.8	751.4	356.6	354.8	92.0
E	38748 + 375 = 39123	32940 + 418 = 37120	22262 + 5445 = 27707	30854 + 2584 = 33438	32733 + 2571 = 35304	29847 + 667 = 30514

lierung zu UTP erfolgt bzw. UTP vermehrt abgebaut wird, sich aber nicht im Rückstand wieder findet, weswegen der Versuch in leicht veränderter Form wiederholt wird.

- (2) Der Versuchsaufbau von E 3 b (1) wurde weitgehend übernommen. Als Unterschied wurden 4 Zeitabnahmen nach 5, 30, 60 und 120 min. abgenommen. Es erfolgte keine Vorinkubation mit B_1 , 20 μCi ^3H -UD und 10^{-3}M B_1 wurden gleichzeitig bei $t=0$ min. zu 200 Mio. EATZ/20 ml zugesetzt. Alle Werte sind wie bei (1) Mittelwerte aus 2 Einzelwerten.

Tabelle 39: Bestimmung der Aktivitätsverluste durch das Aufarbeiten

	cpm	%
2.0 μCi ^3H -UD direkt gezählt	327198.5	100
2.0 μCi ^3H -UD Lyophilisat/aq.	92450.0	28.26
2.0 μCi ^3H -UD Lyophilisat/PEIZ	22310.0	6.82
2.0 μCi ^3H -UD dem Rückstand entsprechend	55496.0	16.96

Bestimmt wurde die in den säurelöslichen Nukleotidpool aufgenommene Aktivität nach Lyophilisieren (A), die gleiche Aktivität nach Auftragen auf PEIZ (B), die Aktivität nach Nukleotiddifferenzierung (C) die Aktivität im hochmolekularen Bereich (D) und die Gesamtaktivität nach Berücksichtigung der Aufarbeitungsverluste (E), jeweils bezogen auf 5 Mio. EATZ.

I-IV sind die Zeitabnahmen der Kontrolle, V-VIII der mit B_1 inkubierten Proben.

Tabelle 40: Beeinflussung des Uridinstoffwechsels durch B₁

	I cpm/%	II cpm/%	III cpm/%	IV cpm/%	V cpm/%	VI cpm/%	VII cpm/%	VIII cpm/%
A	11791	11550	8855	7361	11109	10612	9596	8491
B	1182	1158	856	815	1303	1124	1006	872
C UTP	787.0 / 68.39	546.0 / 48.44	326.75 / 53.43	212.0 / 41.92	608.75 / 65.39	256.0 / 35.85	183.25 / 27.84	97.5 / 18.15
UDP	245.5 / 21.33	322.25 / 28.59	118.25 / 19.34	104.5 / 20.66	181.5 / 19.5	167.0 / 23.39	109.0 / 16.56	102.5 / 19.08
UMP	36.5 / 3.17	87.5 / 7.76	66.75 / 10.92	67.25 / 13.30	35.75 / 3.84	60.0 / 8.40	82.75 / 12.57	41.0 / 7.63
UD	81.75 / 7.10	171.5 / 15.21	99.75 / 16.31	122.0 / 24.12	105.0 / 11.28	231.0 / 32.35	283.25 / 43.03	296.25 / 55.14
GN	1150.75 / 100	1127.25 / 100	611.5 / 100	505.75 / 100	931.0 / 100	714.0 / 100	658.25 / 100	537.25 / 100
D	1073	1588	3464	1998	512	753	1636	1178
E	41723 +6327= 48050	40870 +9363 = 50233	31334 +20425 = 51759	26047 +11781 = 37828	39310 +3019 = 42329	37551 +4440 = 41991	33956 +9646 = 43602	30046 +6946 = 36992

Entsprechend Versuch E 3 b (1) war das Maximum an Aktivität bereits nach 5 min. aufgenommen, wobei unter dem Hydrazon etwa 20% weniger Gesamtaktivität in die Zelle gelangen.

Tabelle 41: Zeitabhängiges Verhältnis von säurelöslicher zu säureunlöslicher Aktivität

	Kontrolle			B ₁		
Zeit (Min)	5	30	60	5	30	60
säurelösliche Aktivität	<u>86.8</u> 13.2	<u>81.4</u> 18.6	<u>60.5</u> 39.5	<u>92.9</u> 7.1	<u>89.4</u> 10.6	<u>77.9</u> 22.1
säureunlösliche Aktivität						

Die Aufnahme von ³H-UD in den hochmolekularen Bereich wird unter B₁ sehr schnell und nachhaltig gehemmt. Der 120 Min. Wert zeigt wie der letzte Zeitwert von Versuch E 3b (1) einen Abfall der Gesamtaktivität für beide Gruppen, der den hoch- und niedermolekularen Anteil gleichmäßig betrifft und nicht mit einer verminderten Zellzahl oder erhöhten Totzahl der Zellen während des Versuchs erklärt werden kann, da diese laufend kontrolliert wurden und konstant blieben.

Analog E 3 b (1) findet man bei der Nukleotiddifferenzierung einen Abfall von 68.4 auf 41.9% UTP der Kontrolle, wogegen der UTP-Anteil unter B₁ auf 18.2% sinkt. Gleichzeitig steigt der Uridingehalt der Kontrolle von 7.1 auf 24.1, der Hydrazon-Zellen von 11.3 auf 55.1% an. Es kommt also unter B₁ zu einer Phosphorylierungshemmung. Hierauf

kann die Einbauhemmung in den hochmolekularen Bereich zurückgeführt werden, wobei jedoch das polymerisierende System noch nicht berücksichtigt ist.

III E 4. Beeinflussung der Aufnahme von ^3H -Thymidin in EATZ und des Einbaus in die DNS durch B_1

(1) Der Versuch beschreibt eine ^3H -Thymidin-Markierung analog Versuch E 3 b (2). 200 Mio. EATZ/20 ml werden 5, 30, 60 und 120 Min. mit und ohne 10^{-3}M B_1 und 200 μCi ^3H -TD inkubiert, alle Angaben stellen Mittelwerte aus zwei bzw. vier Einzelwerten dar.

Zu Beginn wurden die Aktivitätsverluste durch Aufarbeiten bestimmt.

Tabelle 42: Bestimmung der Aktivitätsverluste durch das Aufarbeiten.

	cpm	%
20 μCi ^3H -TD direkt gezählt	2462575.0	100
20 μCi " , Lyophilisat/aq.	993100.0	40.33
20 μCi " , Lyophilisat/PEIZ	255560.0	10.38
20 μCi " , aufgearbeitet wie Rückstand nach b	653602.7	26.54
100 μCi " ,/ 20 Mio. EATZ/20ml, 15 Min. inkubiert, TCA-Rückstand nach a) für 5 Mio. Zellen	1175.9	
100 μCi " /20 Mio. EATZ/20ml, 15 Min. inkubiert, TCA-Rückstand nach b) für 5 Mio. Zellen	2168.3	

Tabelle 43: Beeinflussung des Thymidin-Stoffwechsels durch B₁

	Icpm/%	IIcpm/%	IIIcpm/%	IVcpm/%	Vcpm/%	VIcpm/%	VIIcpm/%	VIIIcpm/%
A	32 189	25 373	17 184	8 915	26 517	24 881	13 578	8 467
B	5 340	4 113	2 953	1 836	4 033	3 641	3 524	2 392
C	2285.5 / 72.33	1885.5 / 73.57	1085.5 / 72.82	433.25/ 65.64	1904.5 / 72.84	1596.0 / 67.73	324.0 / 32.13	214.5 / 37.0
TDF	689.25/ 21.21	480.5 / 18.75	235 / 15.76	66.75/ 10.11	516.75/ 19.77	502.5 / 21.32	226.0 / 22.41	62.75/ 10.82
TME	35.75/ 1.13	22.5 / 0.88	15.25/ 1.02	4.0 / 0.61	45.5 / 1.74	55.5 / 2.63	63.5 / 6.3	12.5 / 2.16
TD	149.5 / 4.73	174.5 / 6.81	155.0 / 10.4	156.0 / 23.64	147.75/ 5.65	202.5 / 8.59	395 / 39.17	290 / 50.02
GN	3160 / 100	2563 / 100	1490.75/ 100	660 / 100	2614.5 / 100	2356.5 / 100	1008.5 / 100	579.75/ 100
D	4454	15 688	18 161	15 922	4 281	15 630	16 072	14 848
E	79814 +16782 = 96596	62 914 +59 111 = 122 025	42 609 +68 429 = 111 038	22 105 +59 993 = 82 098	65 750 +16 130 = 81 880	61 694 +58 892 = 120 586	33 667 +60 558 = 94 225	20 994 +55 946 = 76 940

Da die Aktivitätsbestimmung der hochmolekularen Zellbestandteile nach Methode 14b eine bessere Ausbeute lieferte als nach 14a, wurde der säureunlösliche Rückstand nach 14b aufgearbeitet.

Die Kontrolle von Zellzahl und Totzahl ergab keine Veränderung. Die Bezeichnungen A-E und I-VIII entsprechen E 3 b (2).

Der größte Anteil der Aktivität ist nach 5 Min., das Maximum nach 30 Min. in die Zelle aufgenommen, die Aufnahme an Gesamtaktivität unter B_1 ist um 10% vermindert. Der letzte Zeitwert und auch schon der 60-Min.-Wert zeigen den bekannten Abfall an Aktivität.

Im Gegensatz zum ^3H -Uridin-Einbau zeigt der hochmolekulare Anteil hier keine Beeinträchtigung unter B_1 , am Ende des Versuchs sind bei beiden Gruppen etwa 70% in den hochmolekularen Bereich eingebaut.

Tabelle 44: Zeitabhängiges Verhältnis von säurelöslicher zu säureunlöslicher Aktivität

	Kontrolle				B_1			
Zeit (Min.)	5	30	60	120	5	30	60	120
säurelösliche Aktivität	82.6	51.6	38.4	26.9	80.3	51.2	35.7	27.3
säureunlösliche Aktivität	17.4	48.4	61.6	73.1	19.7	48.8	64.3	72.7

Unter B_1 findet eine Phosphorylierungshemmung statt. Das prozentuale Verhältnis TTP/TD entwickelt sich bei der Kontrolle von 5 nach 120 Minuten von 94/6 nach 74/26, unter B_1 von 93/7 nach 44/56%.

(2) Da mit Versuch III E 4 (1) nur eine schwache Einbauhemmung von ^3H -TD in den hochmolekularen Bereich durch Hydrazonzusatz nachgewiesen werden konnte, jedoch Einbauhemmungen durch Procarbazin von 25% nach 1 Stunde, durch Hydrazin von 40% nach 2 Stunden und durch Methylhydrazin von 70% nach 2 Stunden beschrieben werden (Weitzel et al., 1967) und weiterhin der Abfall an Gesamtaktivität gegen Versuchsende noch ungeklärt war, sollte untersucht werden, ob möglicherweise nicht das Hydrazon sondern eine Mangelsituation durch das Medium den limitierenden Faktor darstellt. Zur Klärung wurden die Zellen in Konzentrationen von 100 Mio./10ml und 20 Mio./10ml Vollmedium eingesetzt, das Lyophilisat in 0.5 bzw. 0.2 ml aq. aufgenommen sowie der Einfluß von jeweils 10^{-3}M A_1 und B_1 miteinander verglichen. Bei einer Inkubationsdauer von 60 bzw. 120 Min. wurde eine Kurzmarkierung von 40 bis 60 bzw. 100 bis 120 Min. mit 100 μCi ^3H -TD/10 ml eingesetzt. Die Aktivität im TCA-Rückstand wurde nach Methode 14b bestimmt.

Tabelle 45: Anordnung der Versuchsgruppen

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Substanz					A_1	A_1	A_1	A_1	B_1	B_1	B_1	B_1
t/min.	60	60	120	120	60	60	120	120	60	60	120	120
Zellzahl/ 10 ml	100	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100	20

Es wurden angegeben:

die säurelösliche Aktivität nach Lyophilisieren (A),
die Aktivität im hochmolekularen Bereich (B),
die gesamte aufgenommene Aktivität (C),
jeweils auf 5 Mio. EATZ bezogen unter Berücksichtigung
der Aufarbeitungsverluste,
die Aktivität des 120 Min.-Wertes in % des 60 Min.-Wertes (D),
die Aktivität der Gruppen V-XII in % der jeweiligen Kontrollgruppe (E),
die Aktivität der niedrigen Zellkonzentration in % der hohen Zellkonzentration (F)
und die hochmolekulare Aktivität in % der Gesamtaktivität (G).

Die Auswertung ergibt, daß

- 1) ein Absinken der Zellkonzentration im Medium einen Aktivitätsabfall von einer zu zwei Stunden Inkubationsdauer unter A_1 und B_1 abmildern kann und bei der Kontrolle sogar zu einem Aktivitätsanstieg nach 2 Stunden führt (Reihe D),
- 2) B_1 eine stärkere Hemmung der Aktivitätsaufnahme als A_1 und A_1 eine stärkere Einbauhemmung bewirkt als B_1 . Die Aufnahmehemmung tritt bei niedriger Zellkonzentration stärker zu Tage (Reihe E), die Einbauhemmung bei hoher Zellkonzentration (Reihe G),
- 3) Zellen der Kontrolle, bei niedriger Eigenkonzentration inkubiert, einen höheren Gehalt an Aktivität besitzen als die in hoher Zellkonzentration. Unter Hydrazin und

Tabelle 46: Ergebnisse III E 4 (2)

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
A	251886	288999	235308	387036	338978	289911	337615	305663	44192	39289	23359	28871
B	197748	303888	150270	407556	20335	33101	4571	4879	28005	22770	5999	10019
C	449634	592887	385650	794592	395313	323012	342186	310542	72197	62059	29358	38890
D			85.8	134.0			95.2	96.1			40.7	62.7
E					79.9	54.5	88.7	39.1	16.1	10.5	7.6	4.9
F		131.9		206.0		90.0		90.8		86.0		132.5
G	44.0	51.3	39.0	51.3	5.7	10.3	1.3	1.6	38.8	36.7	20.4	25.8

Hydrazon treten nur geringe, bzw. nicht einheitliche Unterschiede auf.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die niedrige Zellkonzentration (20 Mio./10 ml) bei der Kontrolle unbeeinflusst über 2 h inkubiert werden kann und deshalb die Ergebnisse nach A₁ und B₁ Behandlung eine größere Aussagekraft haben.

III E 5 Aufhebung der Einbauhemmung von ³H-Thymidin in die DNS von EATZ durch A₁ und B₁ bei Gegenwart von Purinnukleosiden.

Rau und Scholtissek beschreiben 1970 die Aufnahme- und Phosphorylierungshemmung ohne folgende Interferenz mit der RNS-Synthese durch Acridinorange, Pyronin, mehrere Pyrimido-Pyrimidinderivate (Persantin^R) und verschiedene Pteridinderivate. Die kompetetive Hemmung ist reversibel durch Nukleoside, die durch die selbe Nukleosidkinase phosphoryliert werden.

Bei einem strukturellen Vergleich fällt die Ähnlichkeit bezüglich des Grundkörpers von Pteridin, Acridin und Persantin^R mit B₁ und der N-β-Chloräthylgruppe bzw. deren Hydrolyseprodukt N-β-Hydroxyäthyl auf.

Weitzel et al. befassen sich 1967 und 1968 mit Strukturwirkungsbeziehungen von Procarbazin und verwandten Substanzen. Sie finden, daß Hydrazin, Natulan^R und Azonatan eine Einbauhemmung von Thymidin, die beiden letzten Substanzen zusammen mit demethyliertem Natulan^R eine Einbauhemmung von Uridin bewirken, wobei die wirksame Struktur für

die Uridin-Einbauhemmung N-isopropyl-4-formyl-benzamid ist, nachgewiesen mit N-isopropyl-4-formyl-benzamid und 4-Hydroxymethyl-N-isopropyl-benzamid. Diese Struktur ist verantwortlich für eine verminderte Aufnahme in die Zelle und eine intrazelluläre Konzentrationsverminderung der Riboside von Adenin, Cytosin und Uracil sowie der Desoxyriboside von Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin und weiterhin für eine Hemmung der Nukleosiddi- und triphosphatbildung. Hydrazin kann ebenso die Bildung der Purindesoxyriboside auf der Stufe der Ribosereduzierung und/oder einer früheren Synthesestufe hemmen, sichtbar an einer Thymidineinbauhemmung, die aufhebbar ist durch Zugabe von Desoxyadenosin und Desoxyguanosin (je $5 \times 10^{-4} \text{M}$).

Der Anstau an Nukleosiden und Monophosphaten bei gleichzeitiger Absenkung der Di- und Triphosphatkonzentration nach N-isopropyl-4-formyl-benzamid ist analog einer Formaldehyd Behandlung und auch bei N-Methyl- und N-Hydroxymethylderivaten zu finden. Vergleicht man N-Methyl-N- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon mit den o.a. Strukturen, so besteht Übereinstimmung hinsichtlich der N-Methylhydrazinkomponente, nicht der 4-Benzyl-N-isopropyl-carbonamid-Struktur. Um den Wirkungsmechanismus der Testsubstanz abzuklären, sollte die Reversibilität einer Thymidineinbauhemmung durch Zugabe der beiden Purinriboside bzw. der Purindesoxyriboside untersucht werden.

- (1) Es wurden inkubiert 20 Mio. EATZ mit 10^{-3}M A₁/B₁ bzw. ohne Inhibitor zur Kontrolle und mit und ohne Adenosin/Guanosin je $5 \times 10^{-4} \text{M}$ in 10 ml Vollmedium ab $t = 0 \text{ Min.}$

Die Inkubationsdauer betrug 60 und 120 Min., 100 μCi $^3\text{H-TD}$ wurde von 40-60 bzw. 100-120 Min. zugesetzt.

Die Aktivitätsverluste wurden von Versuch E 3 b (2) bzw. bezüglich der direkten Zählung des TCA-Extraktes E 3 b (3-5) von Versuch III E 6 a (1) übernommen.

Bestimmt wurden die in den säurelöslichen Nukleotidpool aufgenommene Aktivität nach Lyophilisieren (1,2 nach Methode 13 a) bzw. aus dem TCA-Extrakt (3-5 nach Methode 13 b) (A), die Aktivität im hochmolekularen Bereich (nach Methode 14 b) (B), die in die Zelle aufgenommene Gesamtaktivität (C), jeweils bezogen auf 5 Mio. EATZ und unter Berücksichtigung der Aufarbeitungsverluste, die Aufhebung der Einbauhemmung bezüglich der Gesamtaktivität durch die Purine, (z.B. $\text{Vx100:I} = a$, $\text{VIx100:I} = b$, $(b-a) = \Delta \%$) = (D), die Aufhebung der Einbauhemmung in den Rückstand durch die Purine, $\Delta \%$ = (E).

- (2) Versuchsanordnung wie (1), jedoch wird nur 1/10 der Aktivität, also 10 $\mu\text{Ci}/10 \text{ ml}$ eingesetzt.
- (3) Versuchsanordnung wie (2), jedoch werden die Purine gleichzeitig mit $^3\text{H-TD}$ zugesetzt. Die säurelösliche Aktivität wird durch Auftragen des TCA-Extrakts auf Filter und Zählen in Toluol-Szintillationsflüssigkeit bestimmt. Bei dieser Methode beträgt der Aktivitätsverlust durch Aufarbeiten 87.86 %.
- (4) Versuchsanordnung wie (3), an Stelle der Purine werden die Desoxypurine zusammen mit $^3\text{H-TD}$ zugesetzt.
- (5) Versuchsanordnung wie (4), die Desoxypurine werden bei $t=0$ Min. zugesetzt.

Tabelle 47: Anordnung der Versuchsgruppen

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Substanz					A ₁	A ₁	A ₁	A ₁	B ₁	B ₁	B ₁	B ₁
t/Min.	60	60	120	120	60	60	120	120	60	60	120	120
Purinzusatz		+		+		+		+		+		+

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

- a) Unter Zusatz der Purine und Desoxypurine enthalten EATZ der Kontrolle und unter A₁ und B₁ weniger Gesamtaktivität,
- b) bei Anbieten der 10-fachen Aktivität wird auch etwa die 10-fache Menge in die Zelle aufgenommen und der Anteil im hochmolekularen Bereich ist erhöht,
- c) unter A₁ und B₁ ist bei Berücksichtigung des 1 h -Wertes im Vergleich zur Kontrolle die Aufnahme an Gesamtaktivität unter den Purinen erhöht, unter den Desoxypurinen erniedrigt. Die 2 h-Werte liegen in der Regel niedriger, schwanken aber sehr stark,
- d) die ³H-Thymidinaufnahme in den hochmolekularen Bereich der EATZ ist unter A₁ und B₁ gehemmt. Weitzel et al. beschreiben 1967 und 1968 die Aufhebung einer Thymidineinbauhemmung nach Hydrazin durch die Desoxypurine. Diese Aufhebung gelingt ebenfalls unter einer A₁ - Inkubation durch die zugesetzten Desoxypurine und zwar besser, wenn die Desoxypurine zu Versuchsbeginn zugesetzt werden als bei kurzfristigem Zusatz zusammen mit ³H-Thymidin. Die Purine können diesen Effekt nicht ausüben, was bedeutet, daß A₁ die Reduktion der Purinriboside hemmt und damit sind in dieser Hinsicht

Tabelle 48: Aufhebung der Thymidin-Einbauehemmung durch A₁ und B₁ mit Purinen und Desoxypurinen in den Versuchsanordnungen (1-5), A-D = cpm, D, E = Δ %

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
(1) A	163 635	102 254	146 201	159 117	291 694	202 142	82 827	43 447	71 966	34 305	7 860	4 746
B	296 590	164 582	328 659	250 433	45 893	61 982	7 121	4 616	10 919	26 375	11 210	4 457
C	460 225	266 836	484 860	409 550	337 587	264 124	90 008	48 063	82 885	60 680	19 070	9 203
D						+25.6		-6.9				-1.6
E						+22.2		-0.3				-1.5
(2) A	23 997	7 885	11 049	12 296	45 326	21 448	29 440	7 305	7 421	5 219	2 874	3 762
B	14 522	3 640	13 783	4 220	4 879	1 161	384	68	3 112	1 161	1 650	1 176
C	38 519	11 525	24 832	16 516	50 205	22 609	29 824	7 973	10 533	6 380	4 524	4 938
D						+65.9		-71.8		+28.0		+11.7
E						-1.7		-1.2		+10.5		+15.3
(3) A	13 616	3 278	12 933	3 979	18 435	7 685	9 992	4 349	5 255	1 878	3 361	1 425
B	14 457	3 485	12 698	3 259	5 554	1 311	309	79	4 209	957	3 297	780
C	28 073	6 763	25 631	7 238	23 989	8 996	10 301	4 428	9 464	2 335	6 658	2 205
D						+47.5		$\pm$ 0		+ 8.2		+4.5
E						- 0.8		$\pm$ 0		- 1.6		-2.1
(4) A	18 657	7 578	19 975	6 631	42 175	7 949	18 822	10 132	7 578	3 171	7 093	2 183
B	21 910	7 351	21 089	7 008	5 241	2 155	543	799	8 022	2 057	6 277	1 463
C	40 567	14 929	41 064	13 639	47 416	10 104	19 365	10 931	15 600	5 228	13 370	3 826
D						-49.2		+33		-3.5		-4.6
E						+ 5.4		+8.8		-8.6		-6.3
(5) A	22 364	13 797	16 063	16 886	58 855	17 175	45 717	25 371	10 503	5 807	9 679	4 366
B	31 748	7 781	25 569	10 723	11 963	6 021	1 097	2 788	12 641	3 599	10 803	4 133
C	54 112	21 578	41 632	27 609	70 818	23 196	46 814	28 159	23 144	9 406	20 482	8 499
D						-23.4		-10.5		+0.8		-18.4
E						+39.7		+21.7		+6.5		-31.8

Hydrazin und A_1 in ihrem Angriffspunkt gleichzusetzen. Der Grund könnte in einer Hemmung des SH-Enzyms Thioredoxin liegen, da A_1 als ein Alkylans für Mercaptogruppen anzusehen ist.

Die Einbauhemmung durch B_1 ist weder durch die Purine noch die Desoxypurine aufzuheben und damit ist ein Angriffspunkt des B_1 an der Purinribose- oder Purindesoxyribosesynthese auszuschließen.

III E 6 a Differenzierung zwischen Aufnahme- und Einbauhemmung von ^3H -Thymidin und ^3H -Uridin durch Kältevorinkubation

Durch weitere Versuche sollte die Frage geklärt werden, ob A_1 und vor allem B_1 neben einer Phosphorylierungs- und Einbauhemmung auch für einen membranabdichtenden Effekt verantwortlich gemacht werden können. Diese beiden Angriffspunkte sollten sich durch ein von Rau und Scholtissek 1970 beschriebenes Verfahren trennen lassen. Von ihnen wurden Hühner-Fibroblasten bei 4°C mit ^3H -Uridin inkubiert, einer Temperatur, die die Aufnahme und Phosphorylierung des Uridins bis zum Triphosphat zuläßt, nicht aber einen Einbau in die RNS. Nach Wegwaschen des nicht aufgenommenen ^3H -Uridins kann man isoliert die Einbauhemmung durch einen Inhibitor bei 37° studieren. Zur Kontrolle werden die Versuche durch Untersuchung der Hemmwirkung von A_1 und B_1 auf Polymerase und die Polymeraseaktivität von Leber-Zellkernen ergänzt.

(1) In diesem Versuch werden in Zeitabhängigkeit Aufnahme- und Phosphorylierungshemmung sowie die Einbauhemmung in die DNS von EATZ (20 Mio./10 ml) bei einem durch Kältevorinkubation bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufgebauten Nukleotidpool von ^3H -Thymidin durch A_1 und B_1 untersucht. Die Kälteinkubation mit 10 μCi ^3H -TD/10 ml erfolgt über eine Stunde von $t = -60$ bis 0 Min., ausnahmsweise wird hier die markierte Substanz vor dem Erwärmen auf $+37^{\circ}$ bei $t = 0$ Min. nicht abgetrennt. Ab $t = 0$ Min. werden die Zellen dann ohne Inhibitor bzw. mit A_1 und B_1 (10^{-3}M) bei 37° für 15, 60 und 120 Min. inkubiert.

Die Bestimmung der Aufarbeitungsverluste erfolgte durch Einsetzen von je 10 μCi ^3H -TD:

10 μCi ^3H -TD in Dioxan-Scfl.	: 1567239.1 cpm = 100%
10 μCi " auf Filter/Toluol-Scfl.	: 384344.0 cpm = 24.5%
10 μCi " in TCA 10% auf Filter/Toluol-Scfl.	: 190265.0 cpm = 12.1%
10 μCi " in 2 ml aq. incl. 2 Tr. TCA auf Filter/Toluol-Scfl.	: 397570.0 cpm = 25.4%

Alle cpm-Angaben beziehen sich auf die eingesetzten 20 Mio. EATZ unter Berücksichtigung der Aufarbeitungsverluste.

I-IV sind die Zeitabnahmen der Kontrollen bei $t=0$, 15, 60 und 120 Minuten, entsprechend V-VII die Abnahmen für A_1 und VIII-X die Abnahmen für B_1 bei $t=15$, 60 und 120 Minuten.

Unter A ist die säurelösliche Aktivität zusammengefaßt, unter B die Aktivität des TCA-Rückstands, unter C die Gesamtaktivität.

Tabelle 49: Aufnahme und Einbau von ^3H -Thymidin in EATZ nach Kältevorinkubation

	I	II	III	IV
A	159917.4	88223.1	70702.5	32933.9
B	165.4	80476.0	362387.8	532110.2
C	160082.8	168699.1	433090.3	565044.1

	V	VI	VII	VIII	IX	X
A	106652.9	180495.9	202851.2	46528.9	20578.5	5578.5
B	61070.9	277261.0	321035.4	36887.8	130519.7	162521.5
C	167723.8	457756.9	523886.6	83416.7	151098.2	168100.0

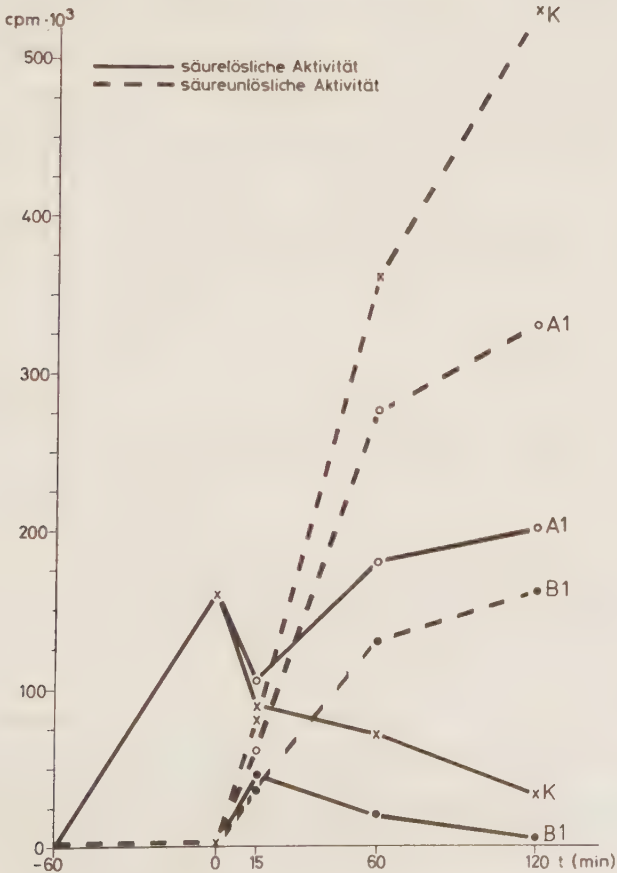


Abb.7: Aufnahme und Einbau von ^3H -Thymidin in EATZ nach Kältevorinkubation

Die prozentuale Nukleotidverteilung des O-Min.-Wertes ergibt einen Anstau des Thymidins auf der Stufe der Mono- und Diphosphate (a), zum Vergleich ist die Nukleotidverteilung nach 1 h Inkubation bei 37° aus Versuch III E 4 (1) angegeben (b):

	TTP	TDP	TMP	TD
(a)	46.9	33.5	9.0	10.6
(b)	72.8	15.8	1.0	10.4

Die Auswertung des Versuchs ergibt, daß mit Hilfe einer Kälteinkubation eine Aufnahme von ^3H -TD in den säurelöslichen Nukleotidpool von EATZ erfolgt, wobei der Einbau in den hochmolekularen Anteil zu vernachlässigen ist. Bei Übergang in Vollmedium von 37° findet bei der Kontrolle über zwei Stunden kontinuierlich ein starker Einbau statt, der so rasant ist, daß trotz des ^3H -TD-Angebots im Medium die Nukleotidkonzentration der Zellen kontinuierlich absinkt.

Unter A_1 entspricht die Gesamtaktivität etwa der Kontrolle, es findet keine Aufnahmehemmung von ^3H -TD statt. Dagegen erfolgt eine Einbauhemmung, die auch aus dem zu Beginn abgesenkten und in der Folge durch neu in die Zelle aufgenommenes ^3H -TD wieder ansteigenden Nukleotidpool ersichtlich ist.

Im Gegensatz zu A_1 findet man unter B_1 eine noch stärkere Einbauhemmung, die jedoch nicht mit einem Anstieg des Nukleotidgehaltes korreliert. Bei nicht von der Kontrolle abweichenden Zell- und Totzahlen liegt hier ein

Aktivitätsverlust vor, dessen Ursache eine Aufnahme-
hemmung sein kann und die sich mit einer Zellabdichtung
erklären läßt.

- (2) Versuch und Auswertung erfolgen analog (1), es wird je-
doch die nicht in die Zelle aufgenommene Aktivität nach
der Kältevorinkubation abgetrennt. Die Aktivität wird
auf 50 μCi ^3H -TD und die Zellzahl auf 45 Mio./10 ml
erhöht.

Die Bestimmung der Aufarbeitungsverluste erfolgte durch
Einsetzen von je 10 μCi ^3H -TD:

10 μCi ^3H -TD in Dioxan-Scfl.	: 1468061.9 cpm = 100%
10 μCi " auf Filter/Toluol-Scfl.:	350378.9 cpm = 23.87%
10 μCi " in TCA 10% auf Filter/ Toluol-Scfl.	: 195756.0 cpm = 13.33%
10 μCi " in 2 ml aq. incl. 2 Tr.: TCA auf Filter/Toluol- Scfl.	361650.0 cpm = 24.64%

Tabelle 50: Aufnahme von ^3H -Thymidin unter Kälteinku-
bation in EATZ, Einbau in den hochmoleku-
laren Bereich der Zelle bei 37° unter A_1
und B_1

	I	II	III	IV
A	1524943.7	243323.3	65866.5	23218.3
B	11179.0	504929.0	845867.0	979048.3
C	1536122.7	748252.3	911733.5	102266.6

	V	VI	VII	VIII	IX	X
A	331057.8	189272.3	218604.7	240547.6	60315.1	17291.8
B	486377.8	795483.0	783948.9	424431.8	716079.6	730028.4
C	817435.6	984755.3	1002553.6	664979.4	776394.7	747320.2

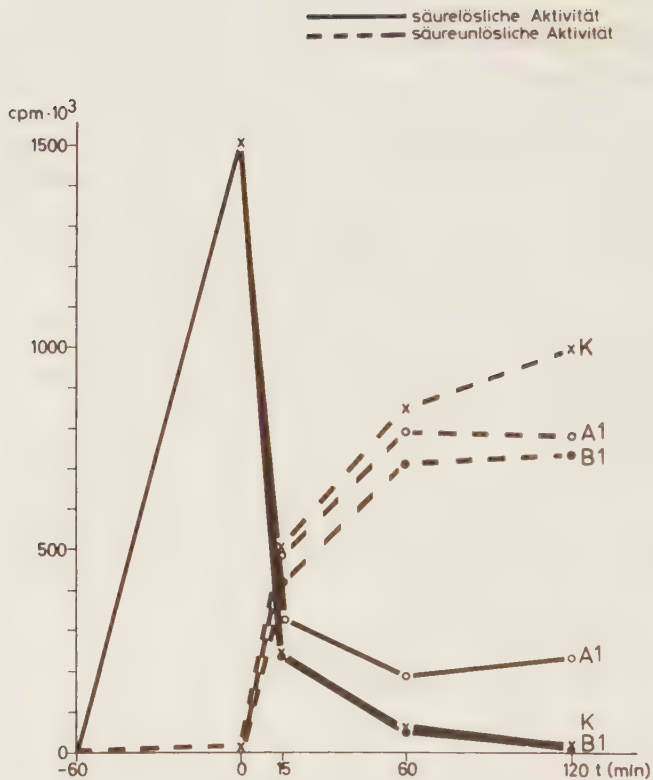


Abb.8: Aufnahme von ^3H -Thymidin unter Kälteinkubation in EATZ, Einbau in den hochmolekularen Bereich der Zelle bei 37° unter A_1 und B_1

Die Einbauhemmung beträgt unter A_1 8-10%, unter B_1 zu Beginn eine zu vernachlässigende Hemmung von 4%, die nach einer Stunde voll reversibel ist.

Auffälligerweise findet unter B_1 wieder ein nicht zu erklärender Verlust an Gesamtaktivität wie schon bei Versuch (1) statt. Es muß hier neben dem in Versuch (1) angesprochenen zellabdichtenden Effekt eine Permeabili-

tätserhöhung diskutiert werden, da Zellzahlen und Totzahlen nicht von der Kontrolle abweichen.

Tabelle 51: Aufgenommene Gesamtaktivität in % der Kontrolle, hochmolekulare Aktivität in % der Gesamtaktivität

	Gesamtaktivität			hochmolekulare Aktivität		
	15	60	120	15	60	120
Minuten						
K	100	100	100	67.5	92.8	97.7
A ₁	109.3	108.0	100.0	59.5	80.8	78.2
B ₁	88.9	85.2	74.6	63.8	92.2	97.7

(3) Versuch und Auswertung erfolgen analog (2), jedoch werden zur Bestimmung des Einbaus in die RNS 50 μCi ^3H -Uridin/45 Mio. EATZ und 10 ml eingesetzt.

Die Bestimmung der Aufarbeitungsverluste erfolgt durch Einsetzen von je 10 μCi ^3H -Uridin:

10 μCi ^3H -UD in Dioxan-Scfl.	: 1512440 cpm = 100%
10 μCi " auf Filter/Toluol-Scfl.	: 377965 cpm = 25.0%
10 μCi " in TCA 10% auf Filter/ Toluol-Scfl.	: 185030 cpm = 12,2%
10 μCi " in 2 ml aq. incl. 2 Tr. TCA auf Filter/Toluol-Scfl.	: 358290 cpm = 23.7%

Die Auswertung ergibt, daß schon während der Kälteinkubation etwa 8% der aufgenommenen Aktivität in den Rückstand eingebaut werden. Nach Erwärmen auf 37° erfolgt innerhalb 15 Min. ein Austausch der Aktivität von niedermolekularem/hochmolekularem Anteil = 60/40, der sich innerhalb aller drei Gruppen bis zu zwei Stunden

Tabelle 52: Aufnahme von ^3H -Uridin unter Kälteinkubation in EATZ, Einbau in den hochmolekularen Bereich der Zelle bei 37°

	I	II	III	IV
A	1649344.3	885655.7	922049.2	889180.3
B	138641.4	603742.6	557489.5	621464.1
C	1787985.7	1489398.3	1479538.7	1510644.4

	V	VI	VII	VIII	IX	X
A	906475.4	1009344.3	923483.6	830983.6	857541.0	796516.4
B	583111.8	563765.8	584854.4	612544.3	571194.1	554934.6
C	1489587.2	1573110.1	1508338.0	1443527.9	1428735.1	1351451.0

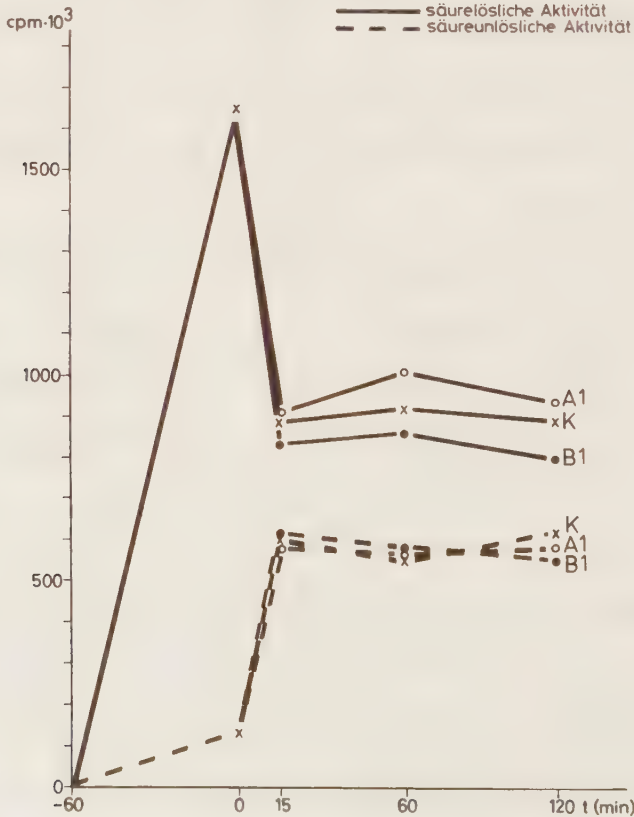


Abb.9: Aufnahme von ^3H -Uridin unter Kälteinkubation in EATZ, Einbau in den hochmolekularen Bereich der Zelle bei 37°

nicht mehr verschiebt.

Beim Vergleich der Gesamtaktivität der drei Gruppen fällt wieder eine Abnahme der Aktivität bei mit B_1 behandelten Zellen auf.

Tabelle 53: Aufgenommene Gesamtaktivität in % der Kontrolle

Minuten	15	60	120
K	100	100	100
A_1	100.0	106.3	99.9
B_1	96.9	96.6	89.5

(4) Da in Versuch (3) keine Kinetik vorhanden war, wurde die Versuchsanordnung in der Weise verändert, daß je 20 Mio. EATZ bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit 50 μCi ^3H -Uridin über 90 Minuten inkubiert wurden und A_1 sowie B_1 schon bei -30 Min. in der Kälte zugesetzt wurden, um eine Zellschädigung vor dem Einsetzen des Einbaus bei erhöhter Temperatur zu setzen. Die Temperatur wurde auf $+15^{\circ}$ statt auf $+37^{\circ}$ erhöht, um durch die tiefere Temperatur einen verlangsamten Stoffwechsel und damit eine Hemmkinetik zu erzielen.

Die Aufarbeitungsverluste wurden mit je 10 μCi ^3H -UD bestimmt:

10 μCi ^3H -UD in Dioxan-Scfl.	: 1471547	= 100%
10 μCi " auf Filter/Toluol-Scfl.:	364953.13	= 24.8%
10 μCi " in TCA 10% auf Filter/ Toluol-Scfl.	: 187015	= 12.7%
10 μCi " in 2 ml aq. incl. 2 Tr.: TCA auf Filter/Toluol-Scfl.:	333165	= 22.6%

Tabelle 54: Aufnahme von ^3H -Uridin unter Kälteinkubation in EATZ, Einbau in den hochmolekularen Bereich der Zelle bei 15°

	I	II	III	IV	V
A	989488	798664	804488	697953	601614
B	30400	60181	89451	87035	95693
C	1019888	858845	893939	784988	697307

	VI	VII	VIII	IX	X	XI
A	937480	753780	604173	837913	663504	537520
B	92193	96173	94384	90319	91294	90195
C	1029673	849953	698557	928232	754798	627715

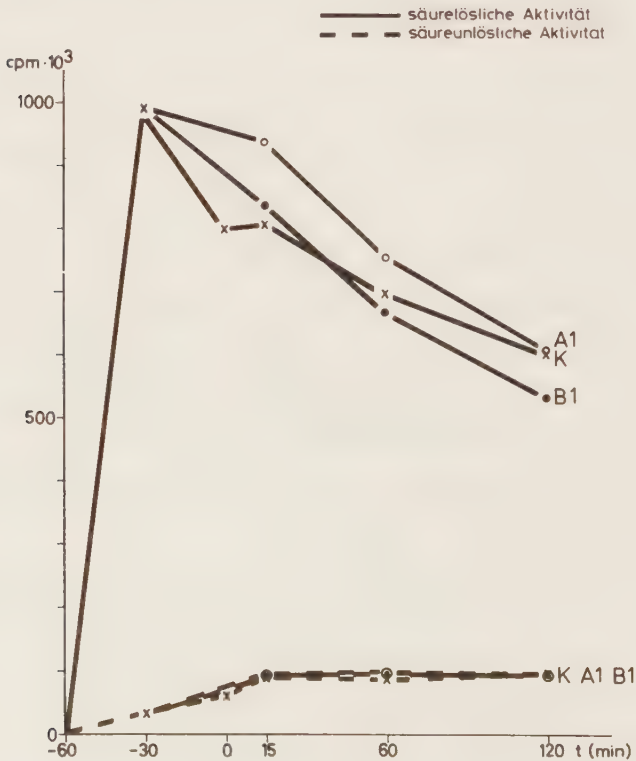


Abb.10: Aufnahme von ^3H -Uridin unter Kälteinkubation in EATZ, Einbau in den hochmolekularen Bereich der Zelle bei 15°

I-V sind die Zeitabnahmen der Kontrolle bei $t = -30, 0, 15, 60, 120$ Min., entsprechend VI-VIII die Abnahme für A_1 und IX-XI die Abnahmen für B_1 bei $t = 15, 60$ und 120 Minuten.

Der Versuch ist nicht auswertbar, da ein Einbau wie bei (3) nur bis zur 15. Minute erfolgt und dann die Rückstandsaktivität konstant bleibt, obwohl die Aktivität im Nukleotidpool sich bei allen drei Gruppen laufend verringert, die Zelle also wieder verlassen müßte. Der Nukleotidpool der Kontrolle in % verschiebt sich von -30 bis $+120$ Minuten.

Tabelle 55: Verschiebung der Nukleotide der Kontrolle von -30 bis $+120$ Minuten

Min.	UTP	UDP	UMP	UD
-30	57.0	20.9	6.7	15.4
+120	8.8	31.5	18.0	41.8

E 6 b Bestimmung der RNS-Polymeraseaktivitäten von Rattenleber-Zellkernen unter A_1 und B_1

Um eine Einbauhemmung von Uridin in die RNS durch A_1 und B_1 nachweisen zu können, wurde ^3H -UTP unter Zusatz von A_1 und B_1 mit Leberzellkernen inkubiert. Die Ribonukleotide werden von der RNS-Polymerase entsprechend der Nukleotidsequenz der DNS in die wachsende Kette als Monophosphat eingebaut, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird.

Untersucht wurde die Beeinflussung der RNS-Polymeraseaktivität in Zeitabhängigkeit (Methode 20a) und die RNS-Polymeraseaktivität in intakten Kernen im Vergleich zur Aktivität der freigesetzten Polymerase, was durch Zerstören der

Kernmembran mit Heparin erreicht wird (Methode 20b).

Tabelle 56: Bestimmung der Polymeraseaktivität von Leberzellkernen unter A_1 und B_1 in Zeitabhängigkeit

	cpm				
Minuten	Kontrolle	A_1 $10^{-4}M$	A_1 $10^{-3}M$	B_1 $10^{-4}M$	B_1 $10^{-3}M$
5	8452	11838	10847	11404	10805
10	20736	20021	17754	22156	19966
20	26378	24486	24855	26548	25113
30	26186	26826	29413	29189	28141

Tabelle 57: Bestimmung der Polymeraseaktivität von Leberzellkernen unter A_1 und B_1 mit und ohne Heparin-Zusatz

	cpm					
Kernzahl/ml	Kontrolle		A_1 $10^{-3}M$		B_1 $10^{-3}M$	
		+Heparin		+Heparin		+Heparin
5×10^6	373	1634	503	1466	473	1793
10×10^6	827	2910	890	2415	787	2771
50×10^6	3945	13814	4373	7771	4344	13945

Die Aktivität der RNS-Polymerase wurde zu keiner Zeit und bei keiner Konzentration von A_1 oder B_1 beeinflusst. Um auszuschließen, daß A_1 oder B_1 durch eine Absorption an die Kernmembran an einer Einwirkung auf die Polymerase gehindert werden, wurde Heparin zugesetzt, welches die Kerne lysiert und gleichzeitig eine Stimulierung der RNS-Polymerase bewirkt. Auch unter Heparin ist keine Aktivitätshemmung durch A_1 und B_1 nachzuweisen. Das bedeutet, daß die beiden Testsubstanzen keinen Einfluß auf das polymerisierende System besitzen und ihr Angriffspunkt am Zellstoffwechsel an

anderer Stelle zu suchen ist, es bedeutet gleichzeitig, daß eine Unterscheidung zwischen Aufnahmehemmung und Einbauhemmung einer markierten Substanz durch A₁ und B₁ über die Polymeraseaktivität nicht möglich ist.

E 7 Untersuchung zum Alkylierungsvermögen von A₁ und B₁

Die Frage nach der alkylierenden Wirkung von A₁ und B₁ wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie geklärt.

Das Alkylans hätte folgende Struktur,



bevorzugt alkyliert wird Guanosin in 7-Stellung. Um ein unterschiedliches Laufverhalten auf der DC-Platte zu untersuchen wurden neben Guanosin und GTP als Testsubstanzen 7-Methyl-Guanosin und 7-Methyl-GTP eingesetzt. Da sich die entsprechenden R_F-Werte deutlich voneinander unterschieden, wurde das gleiche auch von dem durch A₁ und B₁ alkylierten Purin angenommen.

- (1) Im 1. Versuch wurde eine qualitative und grob quantitative Untersuchung der alkylierenden Eigenschaften durch UV-Absorption vorgenommen (Methode 21a). Tritt bei mit B₁ inkubiertem Guanosin kein zusätzlicher Fleck auf, so kann geschlossen werden, daß eine alkylierende Wirkung unter 1% liegt, und das bei einem normalerweise in der Zelle nicht vorkommenden Verhältnis von Purin/Inhibitor = 1/10. Dieses einfache Verfahren besitzt jedoch den Nachteil, daß Guanosin schlecht in kaltem Wasser löslich

ist und Mengen über 5 µg auf der Platte einen Schwanz bilden, was das Trennverhalten verschlechtert. Es konnte jedoch schon eine alkylierende Wirkung des B₁ zu mehr als 1% mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, da 7-Methyl-Guanosin eine höheren R_F-Wert besitzt als Guanosin, folgedessen der Schwanz nicht stört.

- (2) Im zweiten Versuch sollte eine höhere Genauigkeit erreicht werden durch inkubieren von ¹⁴C-Guanosin mit A₁ und B₁ (Methode 21b).

Tabelle 58: DC-Untersuchung alkylierender Eigenschaften von A₁ und B₁ mit ¹⁴C-Guanosin

A ₁ 15 Min.		A ₁ 120 Min.		B ₁ 15 Min.		B ₁ 120 Min.		Kontr. 120 Min.		cm
cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%	
70	0.17	34.5	0.06	137	0.28	68	0.12	52	0.16	0
26	0.06	26.5	0.05	28.5	0.06	42	0.07	30.5	0.09	1
25.5	0.06	43.5	0.08	32.5	0.07	66	0.11	37.5	0.11	2
36	0.09	50.5	0.09	43	0.09	56	0.10	2515	0.08	3
458.5	1.10	608.5	1.08	410.5	0.85	545.5	0.93	331	0.99	4
143.5	0.34	213	0.38	218.5	0.45	245	0.42	101	0.30	5
169.5	0.41	313	0.56	180.5	0.37	245	0.42	168	0.51	6
4012.5	9.59	10561	18.75	3406	7.03	8664	14.77	3375.5	10.14	7
35463.5	84.74	42189	74.90	40685.5	83.92	46247	78.84	27873.5	83.73	8
268	0.64	287.5	0.51	1857.5	3.83	425.5	0.73	189.5	0.57	9
98.5	0.24	178.5	0.32	105	0.22	182.5	0.31	92	0.28	10
261.5	0.63	574.5	1.02	387	0.80	654.5	1.12	379.5	1.14	11
134.5	0.32	201	0.36	210.5	0.43	222	0.38	117	0.35	12
234	0.56	243.5	0.43	326.5	0.67	391.5	0.67	216.5	0.65	13
315	0.75	448	0.80	312.5	0.65	424	0.72	206	0.62	14
102	0.24	304.5	0.54	100	0.21	130	0.22	56.5	0.17	15
27	0.07	36.8	0.07	30	0.06	40	0.07	25.5	0.08	16
5	0.01	12.5	0.02	12	0.03	8.5	0.02	13	0.04	17
Sa. 41850.5		56326.3		48483		58657		33290		

Die graphische Darstellung zeigt einen Einzelpeak von ³H-Guanosin, der bei allen Gruppen etwa die gleiche Aktivität enthält. Die Restaktivität streut auf der Platte mit einer charakteristischen Verteilung, die bei allen

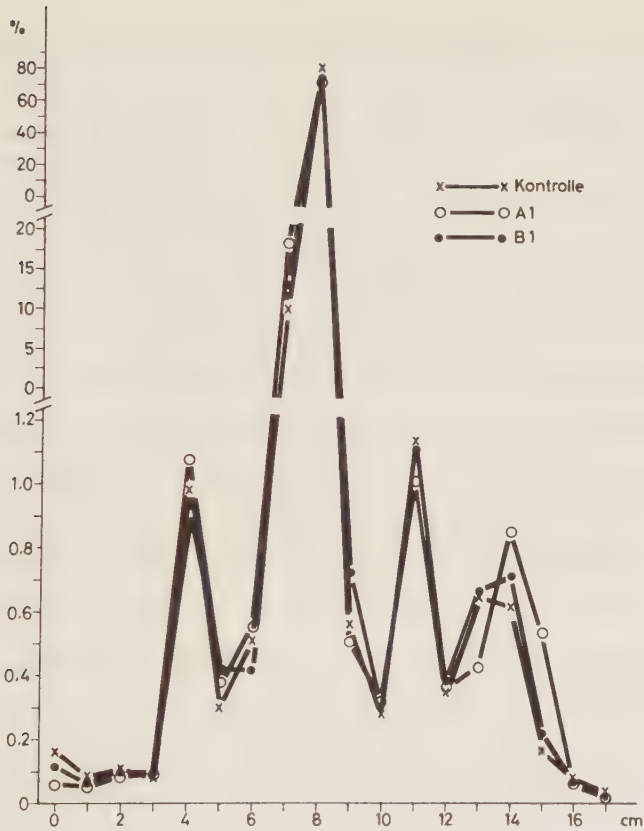


Abb. 11: DC-Untersuchung alkylierender Eigenschaften von A_1 und B_1 mit ^{14}C -Guanosin

drei Gruppen ebenfalls identisch ist, so daß man eine alkylierende Wirkung von A_1 und B_1 ausschließen muß.

III F Untersuchungen zur Cancerogenität von B₁, B₂ und C

III F 1. Prämisse

Neben der akuten Toxicität ist die chronische Toxicität eines Arzneimittels von Bedeutung. Im Falle der Cytostatika und Immunsuppressiva ist die Gefahr der cancerogenen und teratogenen Eigenschaft in besonderem Maße gegeben und deshalb sollte ihre Anwendung nur als Krebschemotherapeutikum bei vitaler Indikation erfolgen und bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses (Lemmel und Botzenhardt, 1976) und zur Nachsorge von chirurgisch entfernten Tumoren kritisch gesehen werden. Das warnende Beispiel der Anwendung des Röntgenkontrastmittels Thoriumdioxysol mit folgender Tumorerzeugung lehrt, daß bei erfolgreich therapierbaren Krankheiten Arzneimittel mit cancerogenen Eigenschaften im Tierexperiment grundsätzlich ausgeschlossen werden sollten und aus diesem Grund bleibt der Einsatz von z.B. INH als Tuberkulostatikum oder Nardil^R als Mao-Hemmer problematisch.

Im Falle von B₁ ist die Gefahr der Cancerogenität auf Grund seiner cytotoxischen Eigenschaft, der engen strukturellen Verwandtschaft zum Procarbazin, sowie der als Äthyleniminmetabolit möglicherweise alkylierend wirkenden N-β-chloräthyl-Gruppierung (vgl. N-Lost-Derivate) ebenfalls in besonderem Maße gegeben.

Da jedoch Procarbazin seit mehreren Jahren trotz seiner bekannten cancerogenen Eigenschaft bei der Behandlung von

Melanomen, Bronchuscarcinomen und Lymphomen, insbesondere der Stadien 3 und 4 des Morbus Hodgkin eingesetzt wird, wäre hier die Anwendung einer ebenso potenten, aber untoxischeren Verbindung wünschenswert.

Im folgenden sind tierexperimentelle Untersuchungen der cancerogenen Eigenschaft des Procarbamins zusammengestellt.

Seit 1964 beschreibt die Gruppe um Kelly und O'Gara wiederholt (Oliverio und Kelly, 1964, Kelly et al., 1964, Kelly et al., 1968) das Auftreten von Neoplasmen nach Anwendung von Procarbamin. 1969 untersuchten Kelly et al. das cancerogene Verhalten von Procarbamin im Vergleich zu dessen potentiellen Abbauprodukten (A) und vergleichbaren Verbindungen (B) an Mäusen.

Eingesetzte Substanzen und Ergebnisse sind im folgenden zusammengestellt. Verglichen wird das Auftreten von multiplen Alveolarcarcinomen, bei Procarbamin und seinem Azoderivat traten zusätzlich Leukämien auf. Die Applikation erfolgte in 8 Dosen über 8 Wochen verteilt, in Abhängigkeit von der Toxizität annähernd äquimolar.

Die Angabenspanne bezieht sich auf unterschiedliche Ergebnisse nach oraler und intraperitonealer Applikation. Bemerkenswert ist, daß Kontrolltiere zu 10-11% Lungentumoren nach einer MLT von 32-33 Wochen zeigten (Tabelle 59).

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte weiterhin (O'Gara, 1971) die Cancerogenität von Procarbamin bei Menschenaffen. Es traten bei zwei von 50 Rhesusaffen bei Latenzzeiten von 17 Monaten und 51/2 Jahren myeloische Leukämien mit 352000

Tabelle 59: Cancerogenitätsvergleich von Procarbazinderivaten und vergleichbaren Substanzen (Kelly et al., 1969)

	Cancero- gene Wir- kung	Tumor- vorkom- men in %	MLT (mittlere Latenz- zeit) in Wochen
(A) $\text{CH}_3\text{-NH-NH-CH}_2\text{-}\phi\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NH-CH (CH}_3\text{)}_2$ Procarbazin	+++	100	16/18
$\text{CH}_3\text{-N=N-CH}_2\text{-}\phi\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NH-CH (CH}_3\text{)}_2$ Azoderivat von Procarbazin	+++	95	53
$\text{CH}_3\text{-NH-N=CH-}\phi\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NH-CH (CH}_3\text{)}_2$ Hydrazonderivat von Procarbazin	+++	67-82	18-28
$\text{OHC-}\phi\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NH-CH (CH}_3\text{)}_2$ Aldehydderivat von Procarbazin	+	5	49
$\text{HOOC-}\phi\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NH-CH (CH}_3\text{)}_2$ (Terephthal-)säurederivat von Procarbazin	++	24	51
$\text{H}_3\text{C-NH-NH}_2$ Methylhydrazin	+	0-10	33
(B) $\text{H}_2\text{N-NH-CH}_2\text{-}\phi$ Benzylhydrazin	-	0	0
$\text{H}_2\text{N-NH-}\phi$ Phenylhydrazin	+	13-14	26-28
$\text{H}_3\text{C-NH-NH-CH}_3$ symmetr. Dimethylhydrazin	+	10-33	29-33
$(\text{H}_3\text{C})_2\text{N-NH}_2$ asymmetr. Dimethylhydrazin	+	3-4	28-32
$\text{H}_2\text{N-NH}_2 \times \text{H}_2\text{SO}_4$ Hydrazinsulfat	++	20-46	28
$\text{H}_2\text{N-NH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-}$  Isonikotinsäurehydrazid (INH)	+	14	49

bzw. 195000 weißen Blutzellen/mm³ gleichzeitig mit Hämorrhagien, leukämisch infiltrierten blutigen Knötchen verschiedener Größe in Haut, Peritoneum, Diaphragma, Muskulatur, Lunge, Zunge und hartem Gaumen auf. Die meisten Lymphknoten waren vergrößert und vereinzelt gestaut. Die beiden Tiere hatten bis zum Ableben 2.69 bzw. 36.3 g Procarbazin sc. und oral erhalten, der Überwachungszeitraum aller Tiere bis zur Veröffentlichung betrug 6 Jahre.

Schmähel und Osswald beziehen 1970 neben Procarbazin u.a. auch Cytostatika mit N-Bis-β-chloräthyl-Gruppierung in ihre Untersuchungen über carcinogene Wirkungen an Maus und Ratte ein. Bei Nachahmung einer lang dauernden Chemotherapie und einer postoperativ empfohlenen kurzfristigen Chemotherapie finden sie bei der Ratte folgende Tumoren unter der hohen Dosierung:

a) Mitomen^R (N-Oxyd-Lost, N-Oxyd-Mustard)

Hämangioendotheliome, lymphatische Leukämien, Stammzell-Leukämien, je ein intraabdominelles Spindelzellsarkom, Lymphosarkom, Osteosarkom, Angiosarkom, Fibrosarkom, sowie ein benignes Fibrom und ein benignes Bronchusadenom.

Insgesamt entwickelten 27% der Tiere maligne Tumoren.

b) Endoxan^R (Cyclophosphamid)

17% der Ratten (hohe Dosierung) entwickelten Phäochromocytome und je ein Meningeom, ein Histiosarkom im Sternum, ein Sarkom in der Inguinalregion und ein Hämangioendotheliom im Bauchraum. Benigne Tumoren waren s.c. wachsende Fibrome und ein Lymphangiom.

c) Natulan^R (Procarbazin)

41% der Tiere entwickelten Nierensarkome, intraabdominelle

Spindelzellsarkome und je ein Adenocarcinom der Niere, Hodencarcinom, Rectomcarcinom, Plattenepithelcarcinom des Gehörganges, malignes Neurilemmom, subaxillares Sarkom, Phäochromocytom und ein multiples sc. Fibrom sowie ein benignes Prostataadenom .

Scherf et al. bestätigen 1971 die stark cancerogene Wirkung von Endoxan^R und Natulan^R, finden aber bei einer Reihe untersuchter Cytostatika keine strenge Korrelation zwischen cancerogener und immunsuppressiver Eigenschaft.

Ivankovic applizierte 1972 tragenden Ratten am 22. Schwangerschaftstag Procarbazin in einer Dosis von 125 mg/kg i.v. Alle 15 aufgezogenen Nachkommen starben nach einer mittleren Latenzzeit von 315 Tagen vorwiegend an neurogenen Malignomen.

Deckers et al. beschreiben 1973 die tumorerzeugende Wirkung von Procarbazin in weiblichen R-Wistar-Ratten. Bei einer Dosis von 225 mg/Tier verteilt über 15 Wochen entwickelten alle Tiere Tumoren mit einer mittleren Latenzzeit von 301 Tagen, im einzelnen in Mamma, Uterus und Gehörgang.

III F 2. Kontrolle des weißen Blutbilds

Eine Blutuntersuchung erfolgte nach 4, 6 und 12 Monaten. Die Ergebnisse beziehen sich auf die gleiche Gruppe bzw. nach 12 Monaten auf etwa die Hälfte dieser Gruppe.

Tabelle 60: Leukozytenzahl nach 4 Monaten

	K _{NaCl}	K _{PO₄}	B ₁	C
Mittelwert	10590	8150	7580	16303
Bereich	7400- 13300	6100- 11100	4100- 14700	6000- 51875
Streuung(N)	2357	2205	3215	13888

Tabelle 61: Leukozytenzahl und Differentialblutbild nach 6 Monaten

	weiße Blutzellen	Lymphoz.	Monoz.	Jug./Stabk.	Segmk.	Eos.
K _{NaCl} M	7160	79.6	2.0	1.6	16.6	0.2
Bereich	4000- 13600	75- 85	0- 4	0- 3	12.0- 23.0	0- 1
Str.(N)	3771	3.32	1.41	1.2	4.18	0.4
K _{PO₄} M	4650	79.0	3.0	0.5	16.0	1.5
Bereich	2400- 10700	75.0- 83.0	2.0- 4.0	0- 2.0	14.0- 18.0	0- 4.0
Str.(N)	4039	2.83	0.71	0.87	2.0	1.5
B ₁ M	6020	81.2	2.6	0.8	14.2	1.2
Bereich	2000- 11200	74.0- 90	0- 8	0- 4	8.0- 20.0	0- 4.0
Str.(N)	2937	5.38	2.69	1.33	3.63	1.33
B ₃ M	7440	80.8	3.9	0.3	13.0	2.0
Bereich	2300- 25000	74.0- 87.0	0- 10	0- 1	7.0- 17.0	0- 5.0
Str. (N)	6638	4.98	2.69	0.47	4.13	2.0
C M	14620	79.2	3.1	0.1	15.0	2.6
Bereich	5700- 30500	67.0- 92.0	1.0- 5.0	0- 1.0	7.0- 28.0	0- 8.0
Str. (N)	7446	7.86	1.3	0.3	7.73	2.2

Tabelle 62: Leukozytenzahl und Differentialblutbild nach 12 Monaten

	weiße Blutzellen	Lymphoz.	Monoz.	Seg./Stab.	Segmk.	Eos.
K _{NaCl} M	7500	73.5	10.5	0	14.5	1.5
Bereich	6400- 8600	63.0- 84.0	5.0- 16.0		11.0- 18.0	0- 3.0
Str. (N)	1556	14.9	7.8		5.0	2.1
K _{PO₄} M	2600	65.0	5.5	0	25.5	4.0
Bereich	2500- 2700	60.0- 70.0	5.0- 6.0		18.0- 33.0	2.0- 6.0
Str. (N)	141	7.1	0.7		10.6	2.8
B ₁ M	3350	75.6	4.8	0	18.0	1.6
Bereich	2000- 5000	70.0- 82.0	2.0- 11.0		13.0- 26.0	0- 4.0
Str. (N)	1273	5.9	3.6		5.2	1.8
B ₃ M	3800	75.5	2.8	0.5	19.5	1.8
Bereich	2300- 5700	65.0- 81.0	0- 6.0	0- 1.0	14.0- 27.0	0- 5.0
Str. (N)	1373	7.2	2.5	0.6	5.5	2.2
C M	6240	81.2	3.4	0.2	13.4	1.8
Bereich	3400- 9200	72.0- 89.0	1.0- 8.0	0- 1.0	7.0- 22.0	0- 5.0
Str. (N)	2688	7.3	2.8	0.5	5.7	1.9

Die Auswertung ergibt keine gravierende Abweichung der Werte behandelter Tiere von Kontrolltieren. Auffallend sind die in der Regel etwas niedrigeren Leukozytenwerte bei Tieren, die eine Phosphat-Lösung injiziert bekamen, jedoch ist dieses Phänomen nicht kausal erklärbar. Die Werte der beiden Hydrazongruppen liegen meist unterhalb, die der Natulangruppe oberhalb der NaCl-Kontrollgruppe, jedoch lagen die tiefen Werte unter Einbeziehung von K_{PO₄} noch im Normbereich. Die

vereinzelte sehr hohen Werte der Natulangruppe bezogen sich ausnahmslos auf Tiere, die infolge der Haltung im Kollektiv stark verbissen waren. Aus diesem Grund wurden die Tiere später einzeln gehalten, worauf sich die Leukozytenzahl wieder normalisierte. Mit Sicherheit konnte keine Leukopenie als Folge einer irreversiblen Knochenmarksschädigung nachgewiesen werden, das in der Literatur beschriebene Auftreten von Leukämie konnte durch ein Differentialblutbild in keinem Fall bei keiner Gruppe nachgewiesen werden.

III F 3. Cancerogenität in Zeitabhängigkeit

Vorkommen von Tumoren und anderen Auffälligkeiten sind in einer Tabelle zusammengestellt. Die häufigsten Tumoren sind Lungentumoren, die sich makroskopisch als glasige, scharf begrenzte Knötchen darstellen.

Tabelle 63: Cancerogenität in Zeitabhängigkeit

	K _{NaCl/PO₄}	B ₁	B ₃	C
nach 5 Tagen	1x Milz vergrößert 2x Leber gefördert	1x Gallenblase gestaut 2x Leber gefördert	1x Gallenblase gestaut 2x Leber gefördert	1x Gallenblase gestaut
nach 1 Monat	4x Milz vergrößert 1x Niere verfärbt 1x Leber gefördert	-	2x Leber gefördert 1x Colon verändert	-
nach 3 Monaten	2x Milz vergrößert	1x Milz vergrößert 1x Leber gefördert	1x Colon verändert	7x Bronchus- carcinome 1x Colon verändert 1x Milz vergrößert
nach 6 Monaten	2x Milz vergrößert	1x Hyperplasie des Lymphge- webes im Co- lon 1x frühes Bron- chuscarcinom	-	5x Bronchuscar- cinome 4x Bronchusa- denome 3x Colonicarci- nome 1x Nasopharyn- gealtumor 1x Leber gefel- dert 2x Milz vergrößert
nach 12 Monaten	-	2x großes Bron- chuscarcinom 3x Bronchuscar- cinom in situ 1x frühes Lymph- adenom im Co- lon 1x Leber gefel- dert	1x großes Bron- chuscarci- nom 4x Bronchuscar- cinom in situ 3x frühes Lymph- adenom im Colon 2x Leber gefel- dert	5x Bronchuscar- cinom 4x Bronchusade- nom 1x Nierentumor 4x frühes Lymph- adenom im Colon

Beurteilung: Zwischen Procarbazin und den Hydrazonen besteht kein genereller Unterschied, lediglich die mittlere Latenzzeit ist kürzer bei Procarbazin, das nach 3 Monaten bei allen Tieren Bronchusadenome oder -carcinome hervorruft. Die cancerogene Wirkung ist organspezifisch auf Lunge und Colon gerichtet. Milz- und Leberveränderungen sind nicht maligne.



Abb. 12 und 13: Lungentumoren, makroskopisch, 12 Monate nach C-Applikation

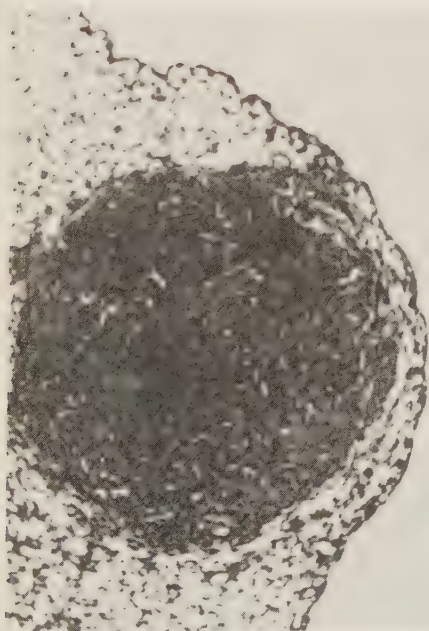


Abb.14:Lungenadenom, 12 Monate nach C-Applikation

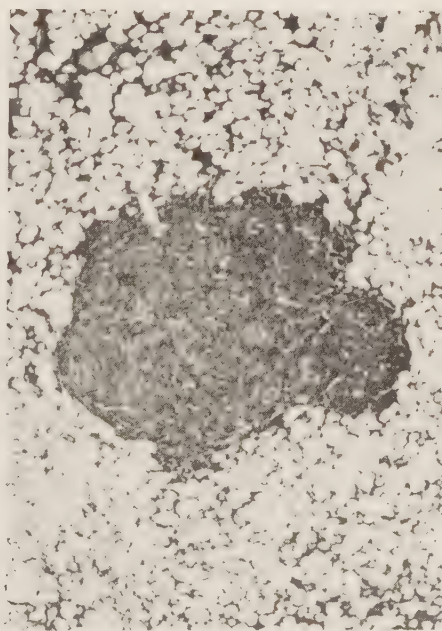


Abb.15:Lungen-Adenocarcinom, 12 Monate nach C-Applikation

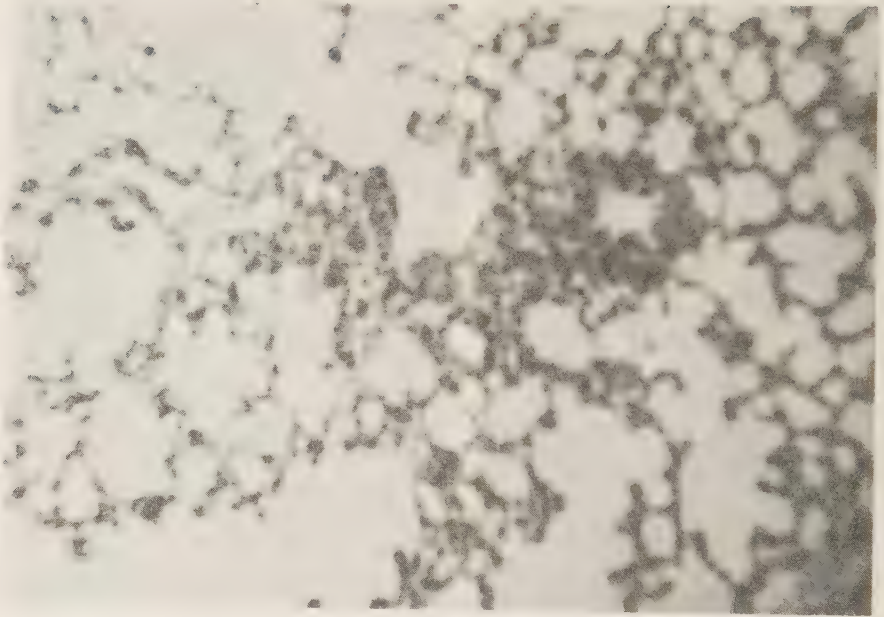


Abb.16: Lungencarcinom, 12 Monate nach B_1 -Applikation, Frühstadium

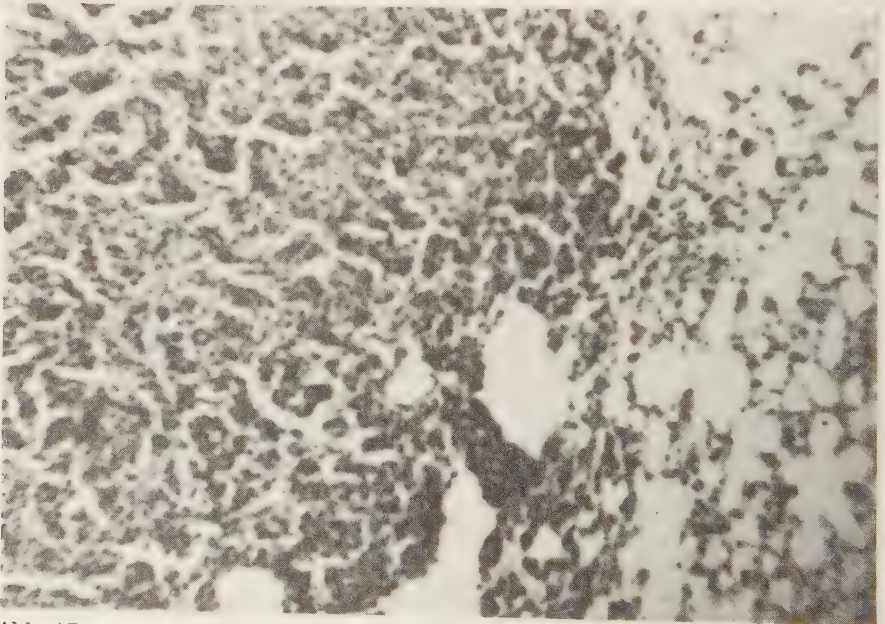


Abb.17: Lungencarcinom, 12 Monate nach B_1 -Applikation



Abb.18 und 19: Nasopharyngealtumor, makroskopisch

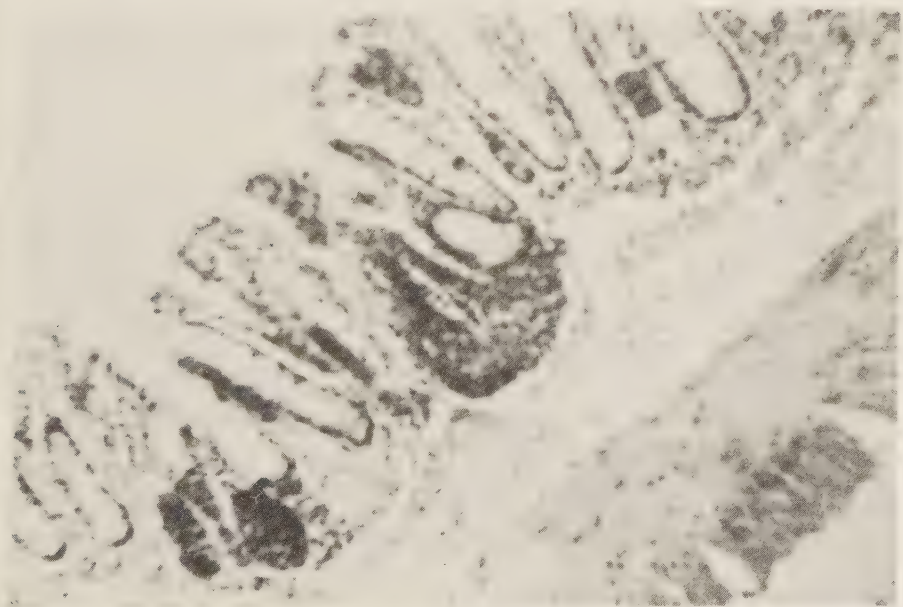


Abb.20: Colonicarcinom, 6 Monate nach C-Applikation

IV Diskussion

N'-Methyl-N'- β -chloräthylhydrazin (A_1) und sein Benzaldehydhydrazon (B_1) hemmten die Entwicklung der untersuchten Tumoren in der Ascitesform stärker als das zum Vergleich herangezogene Monomethylhydrazinderivat Procarbazin (C).

Da, wie aus dem Inkubationsversuch in vitro hervorgeht, die Wirkung von A_1 und B_1 schneller und stärker eintrat als beim Procarbazin muß angenommen werden, daß die Verbindungen entweder selbst wirksam sind, oder schneller als die Monomethylhydrazine aktiviert werden. Da asymmetrisch disubstituierte Alkylhydrazine wie z.B. N,N-Dimethylhydrazin in vitro weniger aktiv waren als A_1 und B_1 (Braun et al., 1976 a) und auch als Monomethylhydrazin, muß die Wirkungssteigerung auf die β -Halogenierung zurückgeführt werden. Dies ist um so erstaunlicher, als Methylamine mit nur einer β -Chloräthylgruppe keine cytostatische Wirkung zeigen. Die Prüfung des Mono- β -chloräthylhydrazins auf wachstumshemmende Eigenschaften war wegen der großen chemischen Unbeständigkeit der Substanz nicht möglich.

Die Überführung von A_1 in sein Benzaldehydhydrazon brachte eine molare Erhöhung der Dtm. auf das Doppelte bei voller Erhaltung der Wirksamkeit. Sie übertrifft auch die des Procarbazins molar um etwa 50%. Die etwas geringere Wirksamkeit des B_1 gegenüber Procarbazin bei tumorferner Applikation läßt vermuten, daß in dem einfachen Benzaldehydhydrazon noch nicht die optimale pharmakokinetische und/oder pharmakodynamische Form des A_1 vorliegt.

Die reversible Cytotoxizität von A_1 , B_1 und Procarbazin ließ sich durch Bestimmung des Mitoseindex von EATZ nachweisen. Ein erhöhter Mitoseindex läßt auf eine bevorzugte Hemmung des Mitosevorganges schließen, wie es bei Cochicin, Colcemid und den Vinca Alkaloiden der Fall ist, die durch Bindung an das Tubulin-Eiweiß dessen Polymerisation verhindern und damit die Bildung der intrazellulären Mikrotubuli und der Spindeln. Ein bevorzugter Eingriff in Stoffwechselvorgänge der Interphase führt zum Absenken der Mitoserate, dies war in unterschiedlichem Ausmaß der Fall bei A_1 , B_1 und Procarbazin. C führte bei beiden Dosierungen zum niedrigsten Mitoseindex, B_1 zur relativ geringsten Beeinträchtigung. B_1 zeigte schon nach 2 Stunden eine deutliche und gleichzeitig maximale Wirkung, A_1 und C zeigten nach 4 Stunden einen deutlichen Effekt, die Wirkung von C hielt am längsten an. Einsetzen, maximaler Effekt und Reversibilität der Senkung des Mitoseindex lassen auf eine entsprechende Stoffwechselbeeinflussung schließen.

Über die Art des Eingriffs sagt die Verschiebung der Mitosephasen näheres aus. Die Phasenverschiebung unter der niedrigen Dosierung macht wiederum die Interferenzstärke deutlich, A_1 und B_1 zeigten nur eine geringe Erhöhung des Metaphasenanteils, C dagegen eine Erhöhung um absolut 14.4%. Unter der hohen Dosierung war die Verschiebung zur Metaphase unter Procarbazin am größten und hielt am längsten an, sie war am geringsten unter B_1 . Die EATZ zeigten 72 Stunden nach Applikation der Substanzen einen Anstieg der ATR-Phasen, der unter A_1 am relativ höchsten war. Der Metaphasenanstieg läßt auf

eine Beeinflussung der RNS- und Proteinsynthese schließen, die eine mangelhafte Spindelausbildung nach sich zieht. Der Abfall der Anaphase unter A_1 und B_1 bzw. ein Verhalten entsprechend der Kontrolle unter C besagt, daß die Verkürzung der Kernspindelfasern nicht behindert ist. A_1 verursachte einen zeitlich begrenzten, B_1 und C einen bis 48 Stunden anhaltenden Anstieg des Telophasenanteils, d.h. B_1 und C verhinderten in stärkerem Ausmaß Vorgänge der Zelldurchschnürung, an denen Mikrotubuli beteiligt sind. In keinem Fall behindert war der Übergang des Mitosekerns zum Interphasenkern im Aufbaustadium des aus Nukleoproteiden bestehenden Chromatingerüsts und durch Ausbildung der Kernhülle, da der Rekombinationsphasenanteil nicht erhöht war, also der Anteil der postmitotisch komplett voneinander getrennten Zellen mit noch sichtbaren Chromosomen. Der Phasenanteil dieser Zellen war unter C auf Grund einer Behinderung in der Telophase stark erniedrigt.

Aus klinischer Sicht ist für die Beurteilung eines Cytostatikums sein Einfluß auf das Blutbild von entscheidender Bedeutung und durch Auftreten von Leuko- und Thrombopenien oft ein therapeutisch limitierender Faktor. Miteinander verglichen wurde daher B_1 mit Natulan^R in hoher äquimolarer Dosis und niedriger äquitoxischer Dosis. Beide Substanzen verursachten eine Leukozytendepression, die bei Procarbazin sehr viel intensiver war und länger andauerte. Unter Procarbazin sanken bei beiden Dosierungen die Leukozytenwerte auf etwa 20% der Kontrolle, unter B_1 verursachte nur die hohe Dosierung ein deutliches Absinken auf 63% der Kontrolle.

Die eigentliche Überraschung stellten jedoch die erhöhten Granulozytenwerte unter B_1 dar. Die Stimulierung der Knochenmarksstammzellen wurde bestätigt durch eine 14-tägige i.p. Applikation von 15 mg/kg B_1 bei der C 57 black-Maus, inkubieren der Knochenmarksstammzellen in vitro mit CSF und Vergleich der Granulozyten- und Makrophagenkolonienzahl mit Kontrollwerten. Die Ursache der Leukozytenstimulation ist unbekannt. Hieraus ergibt sich weiterhin die Frage nach einer Stimulierbarkeit von Leukämiezellen in der G_0 -Phase, um sie nach Überführung in die Proliferationsphase einer Therapie zugänglich zu machen.

Aus der Vielzahl der in der Prämissen III D 1 aufgeführten Immunisierungsmethoden ist ersichtlich, daß durch eine geeignete Vorbehandlung von Versuchstieren mit spezifisch präparierten Tumoren eine an sich bestehende aber unzureichende Immunität soweit gesteigert werden kann, daß Tumoren einer Folgetransplantation abgestoßen werden. Eine maximale Immunität ist etwa 7 Tage nach Stimulierung mit einer Immunogen-Determinanten erreicht, eine kurzfristige Zweitinjektion des Tumors führt zu weniger positiven Ergebnissen, eine Immuntherapie versagt normalerweise.

Zur Immunitätserzeugung wurden die cytotoxischen Eigenschaften von B_1 genutzt. Nach einer 12-stündigen Inkubation von EATZ mit $10^{-3}M$ B_1 waren noch lebende Zellen soweit vorgeschädigt, daß sie nicht mehr zur Tumorentwicklung führten. Die Schädigung konnte auf einer Veränderung der Zelloberfläche beruhen, die die Antigenität für eine Immunantwort ausreichend erhöhte oder auf einer für die Zelle toxischen Stoffwechselschädigung,

die zur Vermehrungsunfähigkeit führte und der Trägermaus ausreichend Zeit zur Immunentwicklung ließ. Die erste Möglichkeit wurde durch einen begleitenden Versuch ausgeschlossen, in welchem mit der physikalischen Methode der Schockgefrierung die EATZ abgetötet wurden und die Empfängermaus ebenfalls eine Immunität entwickelte. Der Versuch besagt, daß auch mit totem Tumormaterial die Erzeugung einer Immunität gelingt und daß auch B_1 geeignet ist, die Zelle ausreichend zu schädigen.

Offen bleibt die Frage, ob eine tote aber morphologisch noch intakte Zelle notwendig ist, bei einer durch Beschallen zerstörten Zelle könnten ebenfalls noch Zellwandpartikel mit intakten Oberflächenantigenen erhalten bleiben.

Die Immunitätsentwicklung drückte sich in einer signifikanten Überlebenszeitverlängerung der vorbehandelten Mäuse aus, die aus einer Unterdrückung der dispersen Tumorform resultierte und im Vorkommen von tumorfreien Tieren.

Mit einem dünnschichtchromatographischen Verfahren wurden durch Auftrennung von Nukleosiden und Nukleotiden von EATZ Angriffspunkte der Hydrazinderivate A_1 und B_1 in der Nukleinsäuresynthese untersucht.

Eine Hemmung der DNS- und RNS- Synthese wurde durch Einsetzen von ^3H -Thymidin und ^3H - Uridin untersucht.

B_1 verursachte eine Behinderung der Uridinaufnahme bis zu 15%, die aber gegen Versuchsende wieder reversibel war. Die in den Zellen enthaltene Gesamtaktivität fiel gegen Versuchsende ab. Der Uridineinbau in die RNS war gehemmt. Im ersten

Versuch wurde aufgenommenes ^3H -Uridin bis maximal 19.7% in den hochmolekularen Bereich eingebaut, unter B_1 bis maximal 7.7%, im zweiten Versuch wurde ^3H -Uridin zu maximal 39.5%, unter B_1 zu maximal 22.1% eingebaut.

Bei beiden Versuchen fand im Gegensatz zur Kontrolle eine starke Verschiebung des UTP/UD-Verhältnisses zugunsten des Uridins statt.

Die ^3H -Thymidin Markierung ergab, daß B_1 eine stärkere Hemmung der Aktivitätsaufnahme verursacht als A_1 . Gegen Versuchsende lag wieder ein Abfall an in die Zelle aufgenommener Aktivität vor. Dieser Abfall ließ sich durch Absenken der Zellkonzentration im Medium vermeiden. Er ist mit adaptiven Veränderungen des Zellstoffwechsels an die in vitro Bedingungen des Vollmediums zu erklären und durch eine Stoffwechselhemmung durch von der Zelle an das Medium abgegebene saure Metaboliten, deren Konzentration von der Zellzahl abhängig ist.

Unter Berücksichtigung des zweiten Thymidin-Einbauversuchs mit erniedrigter Zellkonzentration wurden von der Kontrolle 51.3% der aufgenommenen Aktivität, unter A_1 maximal 10.3% und unter B_1 maximal 36.7% in die TCA-unlösliche Zellfraktion eingebaut, d.h. A_1 bewirkt eine wesentlich stärkere Hemmung der DNS-Synthese als B_1 .

Unter B_1 ist wieder eine im Vergleich zur Kontrolle stärkere Abnahme des Triphosphats zu sehen.

Die von Weitzel et al. (1967 und 1968) beschriebene Aufhebung einer Thymidin-Einbauhemmung durch Zugabe von Desoxyadenosin

und Desoxyguanosin wurde auch für A_1 und B_1 untersucht, da eine strukturelle Ähnlichkeit hinsichtlich der N-Methylhydrazin-Komponente besteht. Durch Zusatz der Purinriboside und Desoxypurinriboside wurde weniger ^3H -Thymidin in die Zelle aufgenommen, was sich mit einer Interferenz bei der Aufnahme in die Zelle erklären läßt.

Durch Zusatz der Desoxypurine zu Versuchsbeginn ließ sich eine Thymidin-Einbauhemmung durch A_1 partiell aufheben, die Aufhebung betrug nach einer Stunde 39.7%, nach 2 Stunden 21.7%, bis zur vollständigen Aufhebung fehlten nach 1 Stunde noch 10.5%, nach 2 Stunden noch 28.9%, d.h. die Wirkung der Desoxypurine ist zeitlich begrenzt. Da die Purine diesen Effekt nicht ausübten, muß A_1 die Ribosereduzierung hemmen.

Weder die Purine noch die Desoxypurine vermochten die Thymidin-Einbauhemmung durch B_1 aufzuheben, demzufolge liegt bei B_1 kein Angriff an der Purinribosid- oder Purindesoxyribosidsynthese vor.

Da A_1 und B_1 sich auf Grund ihrer Struktur mit lipophilem und hydrophilem Anteil in Membranen einlagern und Permeabilitätsveränderungen hervorrufen könnten, wurde eine Einbauhemmung von ^3H -Uridin und ^3H -Thymidin unabhängig von einer Aufnahmebehinderung durch eine Kältevorinkubation der EATZ mit der markierten Substanz untersucht. Bei 4° wurden ^3H -Uridin und ^3H -Thymidin in die Zelle aufgenommen und bis zum Triphosphat phosphoryliert, aber nur zu einem geringen Anteil in den hochmolekularen Bereich der Zelle eingebaut.

Der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNS wurde unter A_1 zu etwa

10% gehemmt, während B_1 praktisch keine Hemmung verursachte. Auffällig ist eine Verminderung des Gehalts an Gesamtaktivität unter B_1 . Prinzipiell ist ein Verlassen der Aktivität der Zelle möglich durch eine Permeabilitätserhöhung der Zellmembran und eine gesteigerte aktive Elimination der Basen. Eine Permeabilitätserhöhung muß nach Versuch III E 6 a (1) ausgeschlossen werden, da hier im Medium verbliebenes ^3H -Thymidin ebenso in die Zelle hineindiffundieren könnte, die Aktivität der Zelle unter diesen Bedingungen aber ebenfalls sank. Eine Erklärung wäre die Behinderung der Ribose-1-phosphat-Bereitstellung, demzufolge wird die Ribose des angebotenen ^3H -Thymidins vermehrt abgespalten und verwendet, die steigende Thymidinkonzentration dagegen durch Elimination der Base verringert. Diese Erklärung wird auch von Krause und Schneider (1973) gegeben, die EATZ in einem glukosefreien Medium Inosin als Ribosequelle anboten und fanden, daß die Zellen verhältnismäßig mehr Radioaktivität aus dem Ribose-Teil als aus dem Basenteil des Inosins in die TCA-unlösliche Zellfraktion einbauten, im einzelnen um 14% weniger Basenanteil in die RNS und um 78% weniger Basenanteil in die DNS. Eine Einbauhemmung von ^3H -Uridin in die RNS unter A_1 und B_1 war unter den gleichen Bedingungen nicht nachzuweisen, da nach einem sehr schnellen Einbau von ^3H -Uridin keine Kinetik mehr vorhanden und demzufolge eine Hemmung von A_1 und B_1 nicht nachzuweisen war. Bei beiden Versuchen trat wieder der bekannte Abfall an Gesamtaktivität unter B_1 ein, was in gleicher Weise wie bei der Thymidin-Markierung erklärt werden kann.

Die Unterscheidung zwischen Aufnahmehemmung und Einbauhemmung von ^3H -UTP über die Bestimmung der RNS-Polymeraseaktivität war nicht möglich, da die Enzymaktivität - isoliert und im intakten Kern gebunden - durch 10^{-3} und 10^{-4}M A_1 und B_1 nicht verändert wurde. Hiermit kann gleichzeitig ein Angriff der beiden Testsubstanzen am polymerisierenden System der Zelle ausgeschlossen werden.

Eine Alkylierung des bevorzugt alkylierten Nukleosids Guanosin durch A_1 oder B_1 konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, offen bleibt noch eine mögliche alkylierende Wirkung auf Phosphatgruppen, eine Alkylierung von SH-Gruppen, z.B. von SH-haltigen Enzymen ist nach Hefter (1977) unwahrscheinlich.

V Zusammenfassung

Die Bestimmung der akuten Toxizität der Testsubstanzen ergab folgende DL_{50} -Werte:

N-Methyl-N'- β -chloräthyl-hydrazin (A_1): 193,9 mg/kg

N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon (B_1): 640 mg/kg

N'-Methyl-N'- β -chloräthyl(3,4-dimethyl-benzaldehyd)hydrazon (B_3): 721.7 mg/kg

N'- β -Chloräthylbenzaldehydhydrazon (B_5): 410.9 mg/kg

N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-(4-pyridylaldehyd)-hydrazon (B_6): 147.5 mg/kg

Durch Umsetzen von A_1 mit Benzaldehyd kann die molare Toxizität auf die Hälfte erniedrigt werden. In einem Zeitraum von 9 Monaten besitzt A_1 im Gegensatz zu B_1 eine hohe chronische Toxizität.

Nach einer ein- und zweistündigen Inkubation von EATZ mit A_1 , B_1 und Procarbazin (C) ist ein progressives Wachstum der Zellen in der Maus unter A_1 und B_1 deutlich gehemmt bzw. nicht mehr nachweisbar.

Die Therapieversuche ergaben, daß B_1 von Mäusen besser vertragen wird als A_1 und daß jeweils die subcutane Applikation besser vertragen wird. Die besten Resultate bringt eine tumornahe i.p. Stoßtherapie von B_1 . Der solide EA-Tumor im Nacken spricht ebenfalls auf eine i.p. Behandlung durch B_1 an, jedoch besitzt hier Procarbazin eine noch bessere Wirksamkeit. B_1 und C sind bei der Therapie des dispersen EAT ebenbürtig.

Bei der Therapie der dispersen und soliden Form des Yoshida-Sarkoms der Ratte waren die Verhältnisse analog, bei der

dispersen Form ist B_1 dem Procarbazin überlegen, bei der soliden Form C dem B_1 .

A_1 , B_1 und C hemmen die Mitose dosisabhängig, C führte zum niedrigsten Mitoseindex und der längsten Depressionsdauer, B_1 zur relativ geringsten Beeinträchtigung. Die Mitosephasenverteilung verschiebt sich unter C von der Pro- zur Metaphase und in geringerem Ausmaß zur Ana- und Telophase. A_1 und B_1 bewirken eine gleichsinnige Verschiebung, jedoch für A_1 in geringerem und für B_1 in noch geringerem Ausmaß. Der Telo-phasenanteil war unter B_1 und C gegenüber A_1 erhöht.

B_1 und C verursachten eine Leukozytendepression, die bei C länger andauerte und bei beiden Dosierungen auf 20% der Kontrolle sank, während B_1 nur unter der hohen Dosierung eine Depression von 63% der Kontrolle bewirkte, die zu Lasten der Lymphozyten ging, wohingegen die Granulozytenwerte erhöht waren. Die Stimulierung der Knochenmarksstammzellen durch B_1 wurde durch eine erhöhte Granulozyten- und Makrophagenkolo-nienzahl nach Inkubieren von Knochenmarkszellen der Maus mit CSF in vitro nachgewiesen.

Nach einer 12-stündigen Inkubation von EATZ mit $10^{-3}M$ B_1 sind die Zellen soweit geschädigt, daß sie nicht mehr zur Tumorentwicklung führen. Innerhalb von 14 Tagen verändert sich die Immunitätslage der Maus so, daß nach Zweitinkubation von EATZ die Tiere tumorfrei bleiben bzw. durch Unterdrückung der dispersen Tumorform die Überlebenszeit signifikant verlängert ist.

Eine Immunität läßt sich auch mit physikalisch abgetöteten

Tumorzellen erzeugen.

B_1 hemmt den Einbau von ^3H -Uridin in die RNS, das UTP/UD-Verhältnis ist zugunsten des Uridins verschoben.

A_1 bewirkt eine wesentlich stärkere Einbauhemmung von ^3H -Thymin in die DNS als B_1 , unter B_1 ist das TTP/TD-Verhältnis zugunsten des Thymins verschoben.

A_1 hemmt die Ribosereduktion, da sich die ^3H -Thymin-Einbauhemmung partiell durch Zusatz der Desoxypurinriboside aufheben läßt, nicht aber durch Zusatz der Purinriboside. Die Einbauhemmung durch B_1 ist nicht aufhebbar.

Der Einbau in die DNS von in die Zelle aufgenommenem und phosphoryliertem ^3H -Thymin nach Kältevorinkubation wird unter A_1 zu etwa 10% gehemmt, nicht dagegen durch B_1 . Demzufolge sind die in der üblichen Versuchsanordnung gefundenen starken Einbauhemmungen durch A_1 und B_1 nicht durch eine Beeinträchtigung des polymerisierenden Systems zu erklären, was auch durch eine fehlende Hemmung der RNS-Polymeraseaktivität bestätigt wurde. B_1 bewirkt eine Verminderung des Gehaltes an Gesamtaktivität nach ^3H -Thymin und ^3H -Uridin Kältevorinkubation, was auf eine Eliminierung der Basen schließen läßt.

Eine Alkylierung des bevorzugt alkylierten Nukleosids Guanosin durch A_1 oder B_1 konnte nicht nachgewiesen werden.

B_1 , B_2 und C besitzen cancerogene Eigenschaften, die sich organspezifisch auf Bronchien und Colon auswirken. Bronchusadenome und Bronchuscarcinome erscheinen bei allen Tieren bereits 3 Monate nach Procarbazinapplikation, nach äquimolaren B_1 - und B_2 -Dosen fanden sich die ersten Neoplasmen erst nach 6 bzw. 12 Monaten.

VI Literaturverzeichnis

- Baker, M.A. and R.N. Taub: Immunotherapy of Human Cancer.
Progr. Allergy Vol. 17, 227 (1973)
- Baldwin, R.W.: Immunological Aspects of Chemical Carcinogenesis.
Advanc. Cancer Research 18, 1 (60), (1973)
- Behringwerke A.G. Marburg: Symposion on Neuraminidase, Marburg/
Lahn (Kongreßecho)
Die Gelben Hefte 14, 90 (1974)
- Bereneis, K., M. Kofler, W. Bollag, A. Kaiser und A. Langemann:
The degradation of deoxyribonucleic acid by new tumor
inhibiting compounds: the intermediate formation of
hydrogen peroxide.
Experientia 19, 3, 132 (1962)
- Böhme, H. und F. Martin: Über β -Chlor- und β -Mesyl-äthyl-
hydrazine.
Arch. Pharmaz. (Weinheim) 307, 272 (1974)
- Bollag, W.: Experimental Studies with Methylhydrazine Derivatives.
Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae Vol. XVII-N.1,
158 (1968)
- Bollag, W. and E. Grunberg: Tumor inhibitory effects of a new
class of cytotoxic agents: methylhydrazine derivatives.
Experientia (Basel) 19, 130 (1963)
- Bradley, T.R. and D. Metcalf: The growth of mouse bone marrow
cells in vitro
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 (1966)
- Braun, R., E. Hefter und K. Weber: Zur Wirkung von N'-Methyl-N'-
 β -chloräthyl-benzaldehyd-hydrazonen auf die aerobe Gly-
kolyse der Ehrlich-Ascites-Zelle.
Arzneimittelforschung (1976), im Druck
- Braun, R. und H. Lange: Über den biologischen Einfluß von N-
Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydra-
zon auf Hefezellen.
Z. Naturforsch. 31 c, 292-297 (1976)

- Braun, R., H. Lange, U. Mangold und R. Mangold: Zur Wirkung von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon auf die RNA- und Proteinsynthese sowie Stoffwechsel von synchronisierten Hefezellen.
Z. Naturforsch. 31 c, 298-303 (1976)
- Braun, R., U. Mangold und R. Mangold: Zum cytostatischen Wirkmechanismus von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon.
Z. Krebsforsch. (1976), im Druck
- Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
- Chauveau, J., Y. Moulé und C. Roiller,
Exptl. Cell Res. 11, 317 (1956)
- Chiura, K. and H.K. Reckendorf: The Nitrofurans (G.P. Ellis, G.B. West).
Progress in medicinal chemistry Bd. 5, 320
- Cohrs, Jaffé und Meessen: Pathologie der Laboratoriumstiere.
Erster Band, Springer Verlag, Berlin (1958)
- Domagk, G., R. Behnisch, F. Mietzsch und H. Schmidt,
Naturwissenschaften 10, 315 (1946)
- Domagk, G., H.A. Offe und W. Siefken,
Beitr. Klin. Tuberkul. 107, 325 (1952)
- Drucy, J. und B.H. Ringer,
Helv. Chim. Acta 34, 195 (1951)
- Emmelot, P.: Biochemical Properties of Normal and Neoplastic Cell Surfaces; a Review.
Europ. J. Cancer Vol. 2, 319 (1973)
- Ferber, E. und K. Resch: Phospholipidstoffwechsel stimulierter Lymphozyten.
Naturwissenschaften 63, 375 (1976)
- Fox, H.H. and J.T. Gibas: Synthetic tuberculostats V. Alkylidene derivatives of Isonicotinyl-hydrazine.
J. Org. Chemistry 18, 983 (1953)

- Froese, G., I. Berczi and A.H. Sehon: Brief Communication:
Neuraminidase-Induced Enhancement of Tumor Growth in
Mice.
Journal of the National Cancer Institute Vol. 52, No.6,
1905 (1974)
- Gale, G.R., J.G. Simpson and A.B. Smith: Studies of the mode of
action of N-Isopropyl-4-(2-methyl-hydrazino)p-toluamide.
Cancer Res. 27, 1186 (1967)
- Gassel, W.D. (Medizinische Poliklinik der Universität Marburg):
Die leukopoetisch determinierte Stammzelle und ihre
stimulierenden Faktoren.
(1977), in Vorbereitung
- Gericke, D. und R. Braun: Zur immunsuppressiven Wirkung von
N'-Methyl-N'- β -chloräthylhydrazonen.
Naturwissenschaften (1977), im Druck
- Grabener, E., Praxis Laboratorium, 5. Auflage,
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 88, 136 (1966)
- Halpern und Pacaud in Pathologie der Laboratoriumstiere
(P. Cohrs, R. Jaffé, H. Meessen),
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, Band 1,
188, 189 (1958)
- Hartveit, F. and B. Halleraker: Histological Demonstration of
a biphasic acute inflammatory response to subcutaneous
transplants of Ehrlich's Carcinoma.
Acta path. microbiol. scand. Section A 79, 43 (1971)
- Hefter, E.: Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Humanmedizin,
Marburg, in Vorbereitung (1977)
- Helfferich, F.: Ion-Exchange Chromatography.
Advan. Chromatog. 1, 3-60 (1965)
- Hellström, I. and K.E. Hellström: Some aspects of the immune de-
fense against Cancer I/II.
Cancer 28, 1266 (1971)

- Huang, A.T., J. Gutterman and P. Hochstein: Cytogenetic changes induced by 1-(N¹-Methylhydrazinomethyl)-N-Isopropyl Benzamide in Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Specialia* 25/2, 203 (1968)
- Humphrey, J.H. und R.G. White, Kurzes Lehrbuch der Immunologie 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1972)
- Isler, O., H. Gutmann, O. Straub, B. Fust, E. Böhm und A. Struder *Helv. chim. Acta* 38, 1033 (1955)
- Ivankovic, S.: Erzeugung von Malignomen bei Ratten nach transplantarer Einwirkung von N-Isopropyl- -2-(methyl-hydrazino)-p-toluamid x HCl. *Arzneimittel-Forschung* 22, Nr.5, 905 (1972)
- Jäckh, R.: Chemie und Biologie der Sialinsäuren. *Chemie in unserer Zeit* Nr. 5, 139 (10. Jahrg. 1976)
- Jones, C.E., J.C. Parker and E.E. Smith: Determination of myocardial acid-soluble nucleotides on anion-exchange thin-layers. *J. Chromatog.* 64, 378 (1972)
- Kelly, M.G., R.W. O'Gara, K. Gaddekar, S.T. Yancey and V.T. Oliverio: Carcinogenic activity of a new antitumor agent, N-isopropyl-~~α~~-(2-methylhydrazino)-p-toluamide, hydrochloride. *Cancer Chemother. Rep.* 39, 77 (1964)
- Kelly, M.G., R.W. O'Gara, S.T. Yancey and C. Botkin: Induction of Tumor in Rats with Procarbazine Hydrochloride. *Journal of the National Cancer Institute* 40, 1027 (1968)
- Kelly, M.G., R.W. O'Gara, S.T. Yancey, K. Gaddekar, C. Botkin and V.T. Oliverio: Comparative Carcinogenicity of N-Isopropyl-~~α~~-(2-Methylhydrazino)-p-Tolu amide x HCl (Procarbazine Hydrochloride), its Degradation Products, other Hydrazines, and Isonicotinic Acid Hydrazide. *Journal of the National Cancer Institute* Vol. 42, No.2 337 (1969)

- Kummer, H. und U. Bucher: Erfahrungen mit einem neuen Cyto-
statikum der Methyl-Hydrazinreihe (Natulan) mit be-
sonderer Berücksichtigung der hämatologischen Nebenwirkun-
gen.
Schweizerische Medizinische Wochenschrift Nr. 37 Bd. 95,
1233 (1965)
- Lee, A.G.: Wechselwirkungen in biologischen Membranen.
Departement of Physiology and Biochemistry, University
of Southampton (1969)
- Lemmel, E.-M und U. Botzenhardt: Immunsuppressive Behandlung der
Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.
Arzneim. - Forsch. (Drug Res.) 26, Nr. 7, 1281 (1976)
- Llombart, A. Jr. and F.P. Mingues: Antimitotic Activity of
the Methylhydrazine Derivative Natulan^R in the Ehrlich
Ascites Carcinoma, Dose-effect Relationship.
Oncology Vol. 23, No. 3, 201 (1969)
- Löffler, M.: Untersuchungen über Zahl, Reaktivität und Funk-
tion von SH-Gruppen an der Oberfläche von Ehrlich-
Ascites-Tumorzellen.
Biochem. Dissertation, Marburg (1974)
- Marx, J.L.: Tumor Immunology I: The Host's Response to Cancer
II: Strategies for Cancer Therapie.
Science Vol. 184, 552/652 (1974)
- Metcalf, D.: Acute antigen-induced elevation of serum colony
stimulating factor (CSF) levels.
Immunol. 21, 427 (1971)
- Metcalf, D. and M.A.S. Moore: Haemopoietic cells.
North Holland Publishing Co. Amsterdam-London (1971)
- Müller, E.: Zum Mechanismus der Glykolyse-Hemmung durch Hydra-
zin-Derivate.
Med. Diss. Marburg (1960)
- Mueller, G.C.: Biochemical events in the animal cell cycle.
Federation Proceedings Vol. 28, No. 6, 1780 (1969)

- Neuhard, J. und A. Munch - Petersen: Studies on the acid-soluble nucleotide pool in thymine-requiring mutants of *Escherichia Coli* during thymine starvation. Changes in the amounts of deoxycytidine triphosphate and deoxyadenosine triphosphate in *Escherichia Coli* 15 T-A-U. *Biochim. Biophys. Acta* 114, 61 (1966)
- Nordlund, J.J. and R.K. Gershon: Splenic regulation of the clinical appearance of small tumors.
The Journal of Immunology Vol. 114, No. 5, 1486 (1975)
- O'Gara, R.W., R.H. Adamson, M.G. Kelly and D.W. Dalgard: Neoplasms of the Hematopoietic System in Nonhuman Primates: Report of one Spontaneous Tumor and two Leukemias Induced by Procarbazine. *Journal of the National Cancer Institute* Vol. 46, No. 6, 1121 (1971)
- Oliverio, V.T. and M.G. Kelly: Contributions to the biological and clinical effect of a methylhydrazine derivative. Some preliminary observations on its physiological disposition, antitumor activity and carcinogenicity. *Chemotherapy of Cancer* New York, Elsevier Publishing Co. 221 (1964)
- Pataki, G. and A. Niederweiser: Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds. Separation on PEI-Cellulose layers using gradient elution and direct fluorometry of spots. *J. Chromatog.* 29, 133 (1967)
- Pataki, G.: Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds. Separation of complex mixtures on cellulose layers. *J. Chromatog.* 29, 126 (1967)
- Petersen, D.F., R.A. Tobey and E.C. Anderson: Synchronously dividing mammalian cells.
Federation Proceedings Vol. 28, No. 6, 1771 (1969)
- Pflüger, K.-H.: Analytische Methoden zur Extraktion und Trennung der freien Nukleotide von Hefe und ihre Anwendung zur Charakterisierung von Veränderungen des Nukleotidpools bei Zellwachstum und Zellvermehrung.
Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Humanmedizin, Marburg, (1975)

- Pletscher, A., P. Zeller und K.E. Gey: Monoaminoxidase-Hemmer.
Fortschritte der Arzneimittelforschung 2, 417 (1960)
- Prescott, B. und G. Caldes,
J. Pharm. Sci. 59, 101 (1970)
- Preussmann, R., C. Satzinger und D. Schmähl: N,N-Bis-(β -chloräthyl)-hydrazin und seine cancerotoxische Wirksamkeit.
Angew. Chemie 70, 743 (1958)
- Randerath, K.: Dünnschichtchromatographie von Nukleinsäurederivaten an Anionenaustauscher-Schichten.
Angew. Chemie 73, 436 (1961)
- Randerath, K.: Polyäthylenimin-Zellulose-ein neuer Anionenaustauscher für die Chromatographie von Nukleotiden
Biochim. Biophys. Acta 61, 852 (1962)
- Randerath, K.: Thin-layer chromatography of nucleotides on layers of cellulose ion-exchangers.
Nature 194, 768 (1962)
- Randerath, K.: Chromatography of nucleotides on a new anion-exchange paper.
J. Chromatog. 10, 235 (1963)
- Rau, J. und C. Scholtissek: Inhibitoren der Nukleosidphosphorylierung in vivo.
Zeitschrift für Naturforschung Band 25b, Heft 3, 292 (1970)
- Reyes, P.: PEI-Cellulose Thin-Layer Chromatography: A highly versatile system for separating purine and pyrimidine nucleotides from nucleosides and free bases.
Analytical Biochemistry 50, 35 (1972)
- Rutishauser, A. and W. Bollag: Cytological Investigations with a New Class of Cytotoxic Agents: Methylhydrazine Derivatives.
Experientia XIX/3, 131 (1963)
- Rutishauser, A. und W. Bollag: Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Procarbazin (Natulan).
Experientia 23, 222 (1967)

- Schäfer, Hirschfeld, Kabierski, Jaffé, Klieneberger und Schermer. in Pathologie der Laboratoriumstiere (P. Cohrs, R. Jaffé, H. Meesen).
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg Band 1,
202-205 (1958)
- Schauer, R.: Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren.
Angew. Chemie Nr. 3, 128 (85. Jahrg. 1973)
- Scharf, H.R., C. Krüger und C. Karsten: Untersuchungen an Ratten über immunsuppressive Eigenschaften von Cyto-
statika unter besonderer Berücksichtigung der carcino-
genen Wirkung.
Arzneimittel-Forschung Heft 10, 1467 (20. Jahrg. 1971)
- Schermer (1954) in Pathologie der Laboratoriumstiere (P. Cohrs, R. Jaffé, H. Meesen)
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg Band 1,
201-203 (1958)
- Seifart, K.H. and B.J. Benecke: Multiple RNA Polymerase
Species from Rat Liver Tissue: Possible Existence of
a Cycloplasmic Enzyme.
Arch. Biochim. Biophys. 151, 519 (1972)
- Schmähl, D. und H. Osswald: Experimentelle Untersuchungen
über carcinogene Wirkungen von Krebs-Chemotherapeutika
und Immunosuppressiva.
Arzneimittel-Forschung Heft 10, 1461 (20. Jahrg. 1970)
- Shay H., M. Gruenstein, M.-B. Shimkin,
Cancer Res. 24, 998 (1964)
- Therman, E.: Chromosome Breakage by 1-Methyl-2-benzyl hydra-
zine in Mouse Cancer Cells.
Cancer Research 32, 1133 (1972)
- Thunold, S.: Acquired immunity after surgical removal of
subcutaneous Ehrlich's Ascites Carcinoma.
Acta path. et microbiol. scandinav. 71 564 (1967)
- Thunold, S.: Local cellular reactions and splenic weight
changes in mice with Ehrlich's Ascites Carcinoma.
Acta path. microbiol. scandinav. 72, 542 (1968)

- Till, J.E. and E.A. McCulloch: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad. Res. 14, 213 (1961)
- Toth, B., Cancer Res. 32, 2818 (1972)
- Trepel, F., Immunologische Tumorthherapie. Med. Klin. 66, Nr. 7, 222 (1971)
- Valdecasas, F.G., Med. clin. (Barcelona) 19, 275 (1952)
- van Heyningen, W.E.: Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. Nature Vol. 249, 415 (1974)
- Wacker, A., W. Dauch und S. Kaul: Aktive Immunisierung und Immuntherapie mit entkernten Tumorzellen. Naturwissenschaften 63, 149 (1976)
- Weitzel, G., F. Schneider und A.-M. Fretzdorff: Cytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. Experientia 20, 38 (1963)
- Weitzel, G., F. Schneider, A.-M. Fretzdorff, J. Durst und W.-D. Hirschmann: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine, II. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 348, 433 (1967)
- Weitzel, G., F. Schneider, W.-D. Hirschmann, J. Durst, R. Thauer, H. Ochs und D. Kummer: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine, III Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 443 (1967)
- Weitzel, G., F. Schneider und H. Ochs: Cytostatischer Wirkungsmechanismus von Natulan. Zeitschrift für Krebsforschung 70, 354 (1968)
- Wilson, K.S., J.A. Ricci and A.J. Grobmeyer, Cancer chemotherapy Reports Part 1 Vol. 54, 243 (1970)
- Zangger, J.: Cytotoxische Effekte durch eine Methylhydrazin-Verbindung. Arzneimittel-Forschung Heft 4, 511 (17. Jahrg. 1967)

Zeller, P., B. Gutmann, A. Hegedüs, A. Kaiser, M. Langemann
and M. Müller: Methylhydrazinederivatives, a new class of
cytotoxic agents.

Experientia (Basel) 19, 129 (1963)

Zimmermann, F.K. and R. Schwaier: A Genetic Effect of Symmetric
Dimethylhydrazine: Induction of Mitotic Recombination.

Naturwissenschaften 54 251 (1967)

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Doz. Dr. rer. nat. R. Braun für die freundliche Überlassung des Themas, seine stets fördernde Unterstützung und sein jederzeit verständnisvolles Entgegenkommen sowie die Übernahme des Correferates danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. K.J. Netter, Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Lahnberge, für die Übernahme des Referates.

L e b e n s l a u f

23.3.1948	Geboren in Lich als Sohn des techn. Angestellten Ludwig Wolf und seiner Ehefrau Gerda, geb. Kropp
1954	Einschulung in die Grundschule in Lich
1958	Aufnahme am Realgymnasium in Hungen
4.11.1966	Abitur
1.12.1966	Pharmazeutisches Praktikum in der Neuen Apotheke in Lich bei dem Apothekerehepaar Gertrud und Günter Freund
25.9.1968	Vorexamen
15.4.1969 - 15.4.1972	Pharmazie Studium am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps Universität Marburg
15.4.1972	Staatsexamen
28.4.1972	Approbation als Apotheker
2.4.1973 - 30.6.1974	Grundwehrdienst als Stabsapotheker in der Tannenbergkaserne Marburg
Seit 1.10.1974	Arbeit an der vorliegenden Dissertation im Rahmen des Humanbiologie-Ergänzungsstudiums am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, wo ich von Dezember 1974 bis April 1977 eine Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter innehatte

Marburg, im Mai 1977

Meine akademischen Lehrer waren:

Amon, Böhme, Braun, Dauner, Ebel, Gallwitz,
Haake, Haberich, Hartke, Hensel, Heubel, Hildebrandt,
Hilp, Ihm, Kating, Kleine, Koransky, v. Kraft, Kriegl-
stein, List, Mannesmann, Mannheim, Matthiessen,
Nultsch, Otto, Petry, Pollmann, Portig, Remschmidt,
Rohen, Sauer, Schiff, Schmitz, Seifart, Seitz, Siess,
Steffen, Steuber, Stutte, Unterhalt, Vogel, Walcher,
Weber, Weigand, Wiegel, Willuhn

